

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1936-1937

N° 24

Avitaminoses et Métabolisme Glucidique Musculaire

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

présentée et soutenue le Juillet 1937

PAR

Roger-Jean-Louis DUFFAU

Pharmacien

JURY }

MM. BOUGAULT, Président.
PICON, Professeur.
BEDEL, Agrégé.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE; 23

1937



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AVITAMINOSES ET MÉTABOLISME
GLUCIDIQUE MUSCULAIRE

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1936-1937

N° 24

Avitaminoses et Métabolisme Glucidique Musculaire

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

présentée et soutenue le Juillet 1937

PAR

Roger-Jean-Louis DUFFAU

Pharmacien

JURY

} MM. BOUGAULT, Président.
PICON, Professeur.
BEDEL, Agrégé.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1937

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUERIN, *Doyen*, O. *, 1.
P. LEBEAU, *Assesseur*, O. *, 1.
P. DESPORT, *Secrétaire*, *, 1.

PROFESSEURS

MM. GUERIN, O. *, 1.	Botanique générale.
PERROT, C. *, 1.	Histoire naturelle des médicaments
COUTIERE, O. *, 1.	Zoologie.
LEBEAU, O. *, 1.	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, *, 1.	Chimie analytique.
GORIS, O. *, 1.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. *, 1.	Physique.
DAMIENS, *, 1.	Chimie minérale.
HERISSEY, O. *, 1.	Chimie biologique.
SOMMELET, *, 1.	Chimie organique.
LUTZ, *, 1.	Cryptogamie et Microbiologie
FABRE, *, 1.	Toxicologie.
LAUNOY, O. *, 1.	Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. *, 1.

Professeurs honoraires : MM. DELEPINE, O. *, 1. et GUERBET, *, 1.
BEHAL, G. O. *, 1.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONNORAT, *, 1.	Législation et Déontologie pharmaceutiques
LAUNOY, O. *, 1.	Pharmacodynamie.
DELABY, *, 1.	Hydrologie et Hygiène
PICON, 1.	Minéralogie.
BACH, 1.	Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, *, 1.	MM. BACH, 1.
PICON, 1.	BEDEL, 1.
MASCRE, 1.	REGNIER, 1.
FLEURY, 1.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, 1., *agrégé*, chargé des T. P. de 1^{re} année..... Chimie générale.
FLEURY, 1. et REGNIER, 1. : *agrégés*,
chargés des travaux de Chimie analytique.
SOUÈGES, 1..... Micrographie.
LEROUX, 1..... Physique.
DEVAL, *, 1..... Microbiologie.
DELABY, *, 1., PICON, 1. et MASCRE, 1. :
agrégés, chargés des travaux généraux de 4^e année.
Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, 1. A.



A MON MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. BOUGAULT

Membre de l'Académie de Médecine

Pharmacien honoraire des Hôpitaux de Paris

Officier de la Légion d'Honneur

Qui me fait le grand honneur de présider cette thèse, en témoignage de mon profond respect.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. PICON
Pharmacien-Chef des Hôpitaux de Paris

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ CH. BEDEL
*Chef des Travaux pratiques de Chimie générale
de la Faculté de Pharmacie de Paris*

En gage de bien vive gratitude.

A MON MAITRE

MONSIEUR RAOUL LECOQ

Pharmacien-Chef de l'Hôpital de Saint-Germain-en-Laye

Qui m'a donné le sujet de cette thèse, en témoignage de ma très vive gratitude et de mon entier dévouement.

A MES MAITRES LYONNAIS ET DIJONNAIS

Témoignage de reconnaissance.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

ALBERT DUFFAU
Pharmacien

A MA MÈRE

En témoignage de ma profonde affection.

A MA FEMME

Qui fut pour moi une collaboratrice enthousiaste, en témoignage de mon affectueuse reconnaissance.

A HENRI VILLAIN

Qui a dirigé mes études secondaires,
et dont la vie laborieuse est pour moi
un exemple.

AUX MIENS

ET A MES AMIS

AVITAMINOSES ET MÉTABOLISME GLUCIDIQUE MUSCULAIRE

INTRODUCTION

La biochimie musculaire a fait des progrès considérables depuis une vingtaine d'années, grâce aux travaux de l'école de MEYERHOF. Il semble à l'heure actuelle qu'on connaisse assez bien le mécanisme des réactions qui se produisent dans le muscle au repos ou au travail et le rôle que jouent les glucides dans ces transformations s'est montré considérable.

On a pu expliquer en particulier, le processus de la dégradation de ces substances par des phénomènes d'oxydoréduction. Or, dans le groupe des vitamines B, la vitamine B₂, riboflavine, est précisément une substance oxydoréductrice. La vitamine C proprement dite ou acide ascorbique jouit également d'un pouvoir oxydoréducteur considérable. Ainsi, par leur nature chimique, certaines vitamines relient le problème de l'alimentation à celui de la biochimie musculaire.

Dans ces conditions, il devenait particulièrement intéressant d'étudier l'influence des avitaminoses sur le métabolisme glucidique du muscle. C'est ce magnifique sujet que notre maître, R. LECOQ, nous proposa lorsque nous vinmes, il y a plus de deux ans, le solliciter de faire une thèse sous sa direction.

Un tel travail devait nécessiter la mise en œuvre de techniques très spéciales. Sur le conseil de M. LECOQ, nous avons été trouver M. le Professeur BOUGAULT dont nous connaissions les travaux minutieux et précis et la haute compétence. Ce maître bienveillant nous accueillit à la Faculté de Paris, avec la plus grande amabilité ; il nous prodigua ses conseils.

nous mettant en garde contre de nombreuses erreurs ; nous conserverons le meilleur souvenir des précieux enseignements que nous avons pu recueillir au cours de nos entretiens avec lui. Nous lui en exprimons toute notre reconnaissance.

Nous remercions M. LECOQ de nous avoir admis avec tant de sympathie dans son laboratoire. Nous sommes heureux de lui dire notre joie d'être son élève et notre fierté de collaborer à ses propres recherches. Nous ne craignons pas d'affirmer que notre vie en a été modifiée. Nous n'avions pas, en effet, rencontré malgré toute notre bonne volonté, dans l'exercice de notre profession, les satisfactions intellectuelles auxquelles la Faculté nous avait accoutumé et nous ne parvenions pas à nous imposer une discipline suffisante pour essayer de les retrouver par nous-même. Il nous manquait l'ambiance. Cette ambiance nous l'avons trouvée au Laboratoire de l'Hôpital de Saint-Germain-en-Laye, où de jeunes chercheurs pharmaciens ou médecins, travaillent comme nous dans l'enthousiasme suscité par l'activité débordante et la valeur scientifique de celui qui les dirige.

Pour épuiser le sujet qui nous était dévolu, le travail d'une thèse ordinaire ne pouvait suffire. Nous avons dû forcément nous limiter, car, au fur et à mesure que nous avançons, nous nous rendions compte que nos résultats suscitaient de nouvelles recherches qui, à elles seules, pouvaient faire l'objet d'autres thèses. Pour nous en tenir aux grandes lignes, nous avons successivement étudié l'influence des quatre avitaminoses fondamentales A, B, C, D, sur le taux des principales substances participant au métabolisme des glucides du muscle.

Le premier chapitre expose ce métabolisme, le second chapitre étudie les techniques de dosage à mettre en œuvre, le troisième chapitre comporte l'application de ces techniques au muscle des animaux normaux. Le chapitre IV apporte une vue d'ensemble sur la question des vitamines. Les cinquième, sixième, septième et huitième chapitres sont consacrés à l'influence respective des avitaminoses A, B, C et D sur le métabolisme glucidique du muscle.

Enfin, dans le neuvième chapitre nous avons, conjointement aux travaux de R. LECOQ, et avec sa collaboration, étudié l'influence du déséquilibre alimentaire glucidique aigu sur le métabolisme des glucides du muscle.

Nous le remercions d'avoir mis à notre entière disposition l'installation de son laboratoire pour toutes ces recherches expérimentales. Elles ont nécessité un grand nombre d'animaux de toutes sortes et la préparation parfois délicate de beaucoup de régimes à base de substances hautement purifiées.

Que M. le Professeur BOUGAULT veuille bien accepter l'expression de notre profonde et sincère gratitude pour le grand honneur qu'il nous fait en voulant bien présider cette thèse.

Que tous ceux enfin qui, d'une façon ou d'une autre, nous ont, au cours de ce travail, apporté leur concours ou leur appui, trouvent ici l'expression de notre reconnaissance :

M. Maurice PETIT, directeur, M. le Docteur JARRY, radiographe et M. CONTREMOULINS, chef du laboratoire de mécanographie de l'Hôpital de Saint-Germain-en-Laye.

Mlle ANTZ qui nous a fait profiter de sa parfaite connaissance de la langue allemande.

Mlle E. JULIEN, M. F. MONORY qui nous ont toujours aidé avec la plus grande complaisance dans les soins à donner à nos animaux et dans l'exécution rapide des techniques de préparation du muscle.

Une aide appréciable nous a été apportée par la subvention de la Fondation VILLEMOT accordée au Laboratoire par l'Académie des Sciences.

CHAPITRE PREMIER

EXPOSE GENERAL DU METABOLISME DES GLUCIDES DANS LE MUSCLE

L'entretien de la vie animale exige la mise en œuvre d'un grand nombre de composés chimiques dont l'organisme emprunte les éléments à l'alimentation.

Il est impossible de dresser la liste complète des principes immédiats indispensables à la vie, mais on a pu diviser les substances organiques qui constituent les aliments et les tissus en trois grands groupes : glucides, protides et lipides. Laissant volontairement de côté les deux derniers, nous nous occuperons uniquement des glucides, nous limitant à l'étude de leurs transformations dans le muscle.

Le muscle est, en effet, pour l'organisme, un réservoir de glucides ; comme le foie, il emmagasine ces substances sous forme de glycogène. Ce glycogène est formé aux dépens du sucre sanguin qui, lui-même, tire la majeure partie de son origine du glycogène hépatique, ce dernier s'élaborant principalement avec les hexoses absorbés au niveau du tube digestif et amenés directement au foie par les veines intestinales et la veine porte. Le métabolisme glucidique du muscle se ramène donc à l'étude de la dégradation du glycogène.

Cette étude a suscité une foule de travaux depuis une vingtaine d'années car elle offre un intérêt capital, étant étroitement liée au problème de l'origine de la force musculaire et de la biochimie de la contraction.

On avait autrefois une conception simpliste du fonctionnement chimique du muscle. En 1887, CHAUVEAU et KAUFMANN (35)

analysant le sang artériel et veineux du masséter du cheval au cours de la contraction, constatèrent que les consommations de glucose et d'oxygène augmentent beaucoup au cours du travail et presque parallèlement. Comme, d'autre part, le taux d'urée excrétée par l'organisme n'augmente pas sensiblement au cours d'un travail violent, ils en conclurent que la combustion du glycogène est la source principale de l'énergie musculaire. Ces conclusions sont toujours exactes, si on les considère comme bilans généraux s'appliquant au muscle pour un temps limité à la durée de la contraction et à la période qui suit immédiatement celle-ci, période dite de réparation. Mais la dégradation du glycogène se fait en une multitude de temps distincts, par une série de réactions interdépendantes.

Pour nous en rendre compte, nous étudierons successivement le muscle au repos et le muscle en travail.

I. — Métabolisme des glucides dans le muscle au repos

Les transformations chimiques qui se produisent dans le muscle au repos sont caractérisées d'une part, par la fermentation lactique du glycogène, d'autre part, par sa combustion. Nous allons exposer le mécanisme général de ces réactions pour étudier ensuite plus spécialement les étapes de la fermentation lactique.

1° FERMENTATION LACTIQUE. — OXYDATION DIRECTE DU GLYCOGÈNE. — RÉACTION DE PASTEUR-MEYERHOFF

Claude BERNARD, épuisant par l'eau un muscle de lapin obtint une solution capable de transformer les glucides en acide lactique.

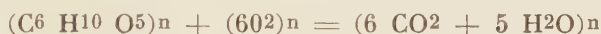
C'est là le point de départ des recherches de l'école de

MEYERHOF qui a étudié les réactions intermédiaires de cette transformation.

La réaction de fermentation lactique du glycogène correspond à l'équation simple :



Cette réaction est réversible. En l'absence d'oxygène libre, elle a lieu de gauche à droite ; elle est exothermique, fournissant $2 n \times 24$ calories. D'autre part, elle est rapide, presque explosive. En présence d'oxygène au contraire, elle a lieu de droite à gauche, elle est endothermique et doit emprunter pour s'effectuer $2 n \times 24$ calories à une réaction simultanée exothermique. Cette dernière réaction exprime la combustion totale d'une partie du glycogène :



En effet, MEYERHOF (172) dosant l'acide lactique d'heure en heure dans du muscle haché, trouva en anaérobiose (dans l'hydrogène) une fermentation lactique croissante (courbe 1),

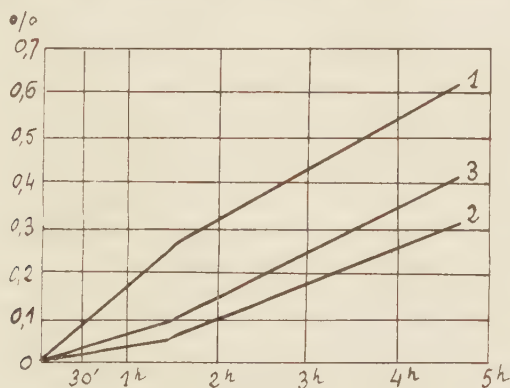


FIG. 1. — En abscisse, le temps en heures.
En ordonnée, le pourcentage d'acide lactique formé.

en aérobiose (dans l'oxygène), une fermentation lactique beaucoup moins rapide (courbe 2). Admettant que le muscle, dans sa respiration, brûle de l'acide lactique, MEYERHOF

construisit enfin une troisième courbe représentant l'acide lactique total formé dans l'oxygène (acide s'accumulant et acide brûlé). Cette courbe 3 reste très en-dessous de la première et montre que la fermentation anaérobie se trouve réduite du fait de la respiration.

La dégradation totale d'une partie du glycogène est, bien entendu, exothermique. On sait que l'énergie de combustion du glucose est de 676 calories (le glycogène possédant à peu près la même).

Il y a là un couplage entre les deux réactions : d'une part, combustion de glycogène, d'autre part, nouvelle formation, ou, comme disent les biologistes, resynthèse du glycogène à partir de l'acide lactique. Ce couplage est désigné sous le nom de réaction de PASTEUR-MEYERHOF.

MEYERHOF et WARBURG (271) ont d'ailleurs généralisé cette notion à la plupart des cellules animales et végétales. Font exception, les cellules embryonnaires ou cancéreuses chez lesquelles, la réaction s'effectue toujours dans le sens de la fermentation lactique, la phase de resynthèse du glycogène étant toujours masquée par celle-ci. Il s'ensuit une grande consommation de glycogène et une imprégnation lactique du tissu musculaire.

Si MEYERHOF admet que, dans sa respiration, le muscle brûle une partie de l'acide lactique, ce point de vue n'est pas partagé par tous les physiologistes. D'autres pensent, en effet, avec LUST et SCHAFFER, que cet acide ne peut être dégradé qu'après avoir été retransformé en glycogène.

Les faits semblent cependant en faveur d'une oxydation directe. RICHARDSON, SCHORR et LÆBEL (240) ont observé un accroissement net de la respiration dans le muscle après addition de lactate. Cet accroissement correspondrait à $1/4$ ou $1/5$ de l'acide lactique ajouté. Les auteurs pensent que cette oxydation est directe car elle ne s'accompagne d'aucune synthèse de glycogène.

Les produits d'oxydation ultérieurs restent jusqu'ici indéterminés. On a proposé divers schémas :

1. Le glycogène s'oxyde en méthylglyoxal qui, par hydrata-

tion, se dédouble en acétaldéhyde et acide formique, dont les produits d'oxydation sont respectivement l'acide acétique, le gaz carbonique et l'eau.

2. Le glycogène s'oxyde en méthylglyoxal qui, par hydratation, donne de l'acide lactique, lequel se dédouble en acétaldéhyde et acide formique comburés ensuite ainsi qu'il vient d'être indiqué. Ce schéma est, comme on voit, celui des partisans de l'oxydation de l'acide lactique.

3. Le glycogène s'oxyde en méthylglyoxal qui, par oxydation, donne de l'acide pyruvique, lequel sous l'influence d'une diastase (α carboxylase) se dédouble en acétaldéhyde et anhydride carbonique, la diastase libérant le groupement CO_2 des acides cétoniques. Ajoutons que cette réaction démontrée pour la levure est contestée en ce qui concerne le tissu musculaire.

2° ETAPES DE LA FERMENTATION LACTIQUE

On ignore encore la constitution du ferment musculaire, mais grâce aux travaux de LOHMANN (151), (152), (153), (155), et de FIKSE et SUBAROW (73) on est arrivé à connaître assez bien le coferment qui est complexe et qui, nous allons le voir, présente d'étroites analogies avec le coferment de la levure de bière.

Dès 1906, HARDEN et YOUNG (98) divisaient la zymase de la fermentation alcoolique en deux constituants : l'un dialysable et thermostable, la cozymase de HARDEN et YOUNG, l'autre non dialysable et thermolabile, l'apozymase. Séparés, ces deux constituants sont inactifs ; réunis ils font fermenter le sucre en alcool.

De même, MEYERHOF (169) (170) en 1918, réussit à isoler du ferment lactique musculaire, deux constituants, un apoferment et un coferment, ce dernier dialysable et stable. Or, le coferment du muscle peut être remplacé par la cozymase de la levure et réciproquement dans l'une ou l'autre fermentation lactique ou alcoolique.

On sait, aujourd'hui, que, dans les deux cas, le coferment

se montre formé de pyrophosphate, de nucléotide et de sel de magnésium ; le pyrophosphate seul se montre inactif.

En 1928, LOHMANN (152) (153) a découvert la présence de pyrophosphates dans le muscle et dans toutes les cellules vivantes. Un an après, il a prouvé que les pyrophosphates ne sont pas libres, mais combinés à l'acide adénylique qui avait été trouvé dans les muscles par EMBDEN en 1927 (66). Ultérieurement, LOHMANN (155) a isolé un adénylpyrophosphate de la purée musculaire dont les solutions aqueuses sont stables et qui se trouve rapidement hydrolysé par les ferments du muscle. Il a précisé la vitesse d'hydrolyse de ce corps dans l'acide chlorhydrique normal à 100° et construit les courbes reproduites ci-dessous dans lesquelles la durée d'hydrolyse en minutes est portée en abscisse et le taux d'acide phosphorique libéré par gramme de muscle (exprimé en P_2O_5) est porté en ordonnée.

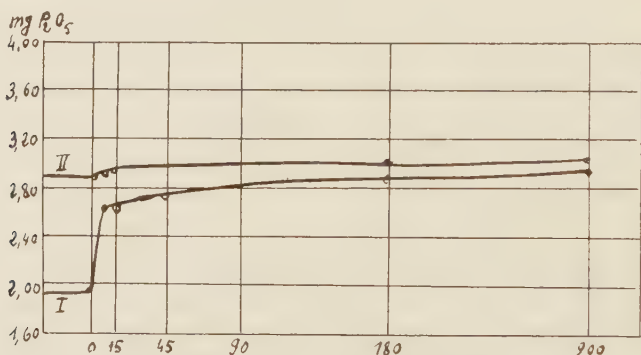


FIG. 2. — La courbe I représente le phosphate libéré dans une purée musculaire fraîche mise immédiatement en milieu chlorhydrique normal à 100° .

La courbe II est déterminée de la même façon mais avec une purée musculaire qui a été soumise au préalable à une autolyse de 2 heures à 38° .

Il s'agit bien, en l'espèce, d'une hydrolyse de l'acide pyrophosphorique car LOHMANN, en ajoutant du pyrophosphate de soude à sa purée musculaire, a obtenu des courbes encore plus caractéristiques (fig. 3).

de la liaison ribose-acide phosphorique. Cozymase et coferment lactique, quoique constitués tous deux par un pyrophosphate de nucléotide, ne sont donc pas absolument identiques.

La similitude des fermentations alcoolique et lactique se montre cependant remarquable.

Dans les deux cas, en effet, le premier stade de la dégradation du glycogène est son hydrolyse en glucose suivie de la formation d'esters hexosephosphoriques, processus bien étudié par EMBDEN et ses élèves LAQUER et ZIMMERMANN (64) (65) dans le muscle et préalablement élucidé par HARDEN et YOUNG (98) dans la fermentation alcoolique.

L'acide adénylpyrophosphorique s'hydrolyse en acide inosique, ammoniaque et acide phosphorique avec libération de 34 calories par molécule. L'acide phosphorique se porte sur la molécule de glucose et l'estérifie. Il a formation d'un ester diphosphorique, dit de HARDEN et YOUNG, découvert par ces auteurs en 1909 dans le suc de presse de levure en fermentation, et qui est l'ester fructofuranose 1-6 diphosphorique.

On a, d'autre part, isolé dans les extraits fermentaires musculaires ou alcooliques, deux esters différents : l'ester de NEUBERG (194) ou ester fructofuranose 6, monophosphorique, et l'ester de ROBISON (241), ester glucopyranose 6, monophosphorique. Le nom d'ester d'EMBDEN a été donné à un ester hexosemonophosphorique isolé par cet auteur de la purée musculaire, en 1926, et baptisé du nom lactocidogène. Il présente des analogies extrêmement marquées avec l'ester de ROBISON.

Les recherches de LOHMANN ont montré que tous ces esters naturels sont des mélanges de deux constituants au moins, dont l'un est un cétose, l'autre un aldose. Les deux constituants se distinguent, d'après cet auteur, par la vitesse avec laquelle ils s'hydrolysent en milieu chlorhydrique normal. En effet, la constante de la vitesse d'hydrolyse donnée par la formule classique :

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$$

(où t désigne le temps en secondes ; a la valeur initiale ; x la quantité transformée au temps t), ne garde pas la même valeur au cours de toute la durée de l'hydrolyse comme ce serait le cas pour un ester homogène ; la grandeur K diminue nettement au bout d'un certain temps, car l'ester de l'aldose est plus difficilement hydrolysable que celui du cétose.

Nous donnons ci-après les courbes de LOHMANN ; en abscisse le temps est porté en heures et en ordonnée figure le pourcentage d'acide phosphorique hydrolysé exprimé en milligrammes de P_2O_5 (voir figure)

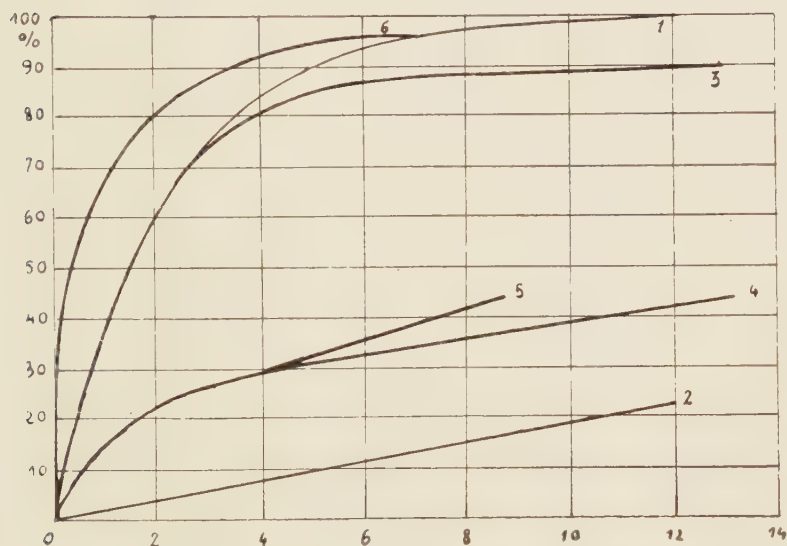


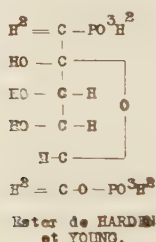
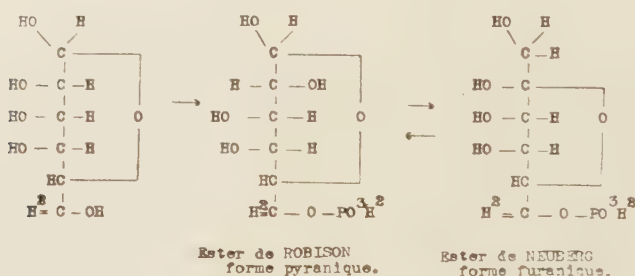
FIG. 4. — Les courbes 1 et 2 correspondent respectivement aux vitesses théoriques pour $K = 3,23 \times 10^{-3}$ et $0,15 \times 10^{-3}$, deux constantes déterminées par le calcul. (L'auteur fait d'ailleurs remarquer que, dans ce calcul, il a utilisé les log. à base 10 et non à base e).

Toutes les autres courbes sont les courbes vraies déterminées par des dosages multiples : la courbe 3 concerne l'ester de Neuberg ; la courbe 4 l'ester d'Embden ; la courbe 5 l'ester de Robinson et la courbe 6 l'ester de Harden et Young.

On voit tout de suite que les esters se divisent en deux groupes : ceux dont l'hydrolyse est relativement rapide dans les trois premières heures (facilement hydrolysables) et ceux

dont l'hydrolyse est lente (difficilement hydrolysables). Nous y reviendrons à propos de leur dosage.

La courbe de l'ester de NEUBERG montre un fléchissement très net. Sa vitesse initiale correspond à $K = 3,23 \times 10^{-3}$ et sa vitesse finale à $K = 0,15 \times 10^{-3}$. LOHMANN en déduit que cet ester doit contenir 4/5 de cétose et 1/5 d'aldose. On est ainsi conduit à admettre qu'il s'établit un équilibre entre les esters de ROBISON et de NEUBERG et que la dégradation se produit selon le schéma ci-après :



L'établissement de ces formules de constitution résulte des travaux de MORGAN et ROBISON (181), de LEVENE et RAYMOND (146) pour les deux dernières et de ROBISON et KING (242) pour l'ester de ROBISON.

Dans la forme furanique, l'ester est cétonique ; il est aldéhydique dans la forme pyranique. Il est probable que c'est l'estérification de la fonction alcool primaire qui empêche le glissement du pont d'oxygène jusqu'au 6^e carbone. Cette tauto-

mérisation est intéressante car l'hypothèse d'une forme furannique fugitive du glucose sanguin ayant été émise, on voit ici cette forme stabilisée grâce à l'estérification phosphorique.

Ces esters ont des constantes de dissociation et des pouvoirs réducteurs différents. Nous y reviendrons plus loin.

Les esters naturels s'hydrolysent dans l'extrait musculaire et fournissent de l'acide lactique et de l'acide phosphorique, ce que ne font pas les esters de synthèse. Il faut donc admettre que les premiers sont vraisemblablement plus complexes, ce qui confirme les résultats de LOHMANN.

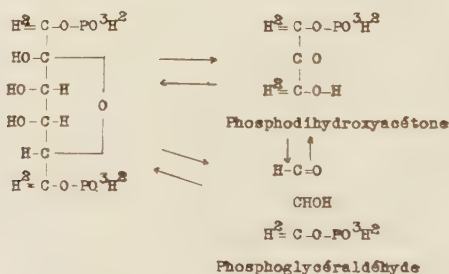
Enfin, le schéma ci-dessus est justifié par diverses expériences consistant à bloquer la fermentation à un stade déterminé dans des extraits musculaires, par des poisons appropriés (fluorures ou oxalates alcalins) ainsi que l'ont montré MEYERHOF (172) et EMBDEN (63). Il ne se forme, dans ces conditions, jamais d'acide lactique, mais les glucides disparaissent et les esters que nous venons de décrire s'accumulent dans le jus de fermentation jusqu'à disparition de tout l'acide phosphorique minéral.

Nous avons déjà signalé que le coferment était constitué par un pyrophosphate de nucléotide, en l'espèce l'acide adénylpyrophosphorique et par un sel de magnésium. Le pyrophosphate seul s'avère inactif (LOHMANN, 156). Son rôle comme celui du magnésium n'est pas encore élucidé. On sait seulement que la vitesse de formation d'acide lactique dans un extrait de muscle est fonction de sa teneur en acide adénylpyrophosphorique et en magnésium. Il est même possible de remplacer une fraction de l'un de ces corps par l'autre et inversement sans faire varier la production d'acide lactique.

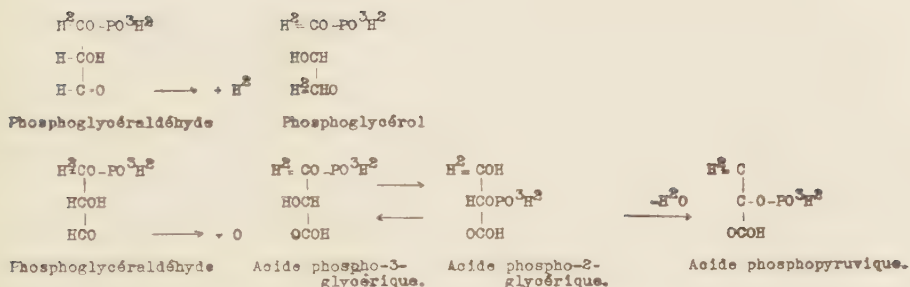
Quels sont donc les composés intermédiaires entre ces esters et l'acide lactique ? Dans la fermentation alcoolique, on a trouvé du méthylglyoxal en petite quantité provenant de la scission des esters hexosephosphoriques. D'autre part, on sait que toutes les cellules animales ou végétales contiennent un ferment, la méthylglyoxalase qui transforme le méthylglyoxal en acide lactique. D'après BARRENSCHEEN et LOHMANN, le glutathion réduit serait le coferment indispensable à l'action de

cette méthylglyoxalase. On est en droit d'admettre que la transformation des esters hexosephosphoriques en acide lactique se fait par l'étape du méthylglyoxal. CAHN et HOUGET (29), citant les travaux de VOGT, SYM et LOHMANN qui ont obtenu du méthylglyoxal et de l'acide lactique au moyen d'un extrait musculaire débarrassé d'acide adénylpyrophosphorique par dialyse et agissant sur l'ester de HARDEN et YOUNG se rallient à cette opinion.

On admet également avec WAREMBOURG (273) que l'ester hexosediphosphorique se scinde en deux molécules de triosephosphates, mélange de phosphodihydroxyacétone et de phosphoglyceraldéhyde. Mais comme ce dernier corps se transpose immédiatement dans un dialysat d'extrait de muscle dans la proportion de 90 % en phosphodihydroxyacétone, on ne peut pratiquement isoler que cette dernière. Un équilibre s'établit d'ailleurs entre l'ester de HARDEN et YOUNG et ses produits de scission, toutes ces réactions étant réversibles conformément au schéma ci-après :



La dégradation se continue ensuite par un phénomène d'oxydoréduction irréversible, 2 molécules de phosphoglyceraldéhyde donnant respectivement du phosphoglycérol par réduction et de l'acide phosho-3-glycérique par oxydation. L'acide iodacétique ajouté à l'extrait fermentaire inhibe d'ailleurs cette oxydoréduction des triosesphosphates. L'acide phosho-3-glycérique se tautomérisé alors en acide phosho-2-glycérique qui se déshydrate en acide phosphopyruvique. On a alors le schéma ci-dessous que nous empruntons à l'ouvrage de WAREMBOURG :



Ensuite, l'acide phosphopyruvique se dédouble en acide phosphorique et acide pyruvique. La réalité du bilan de cette dégradation de l'acide phosphoglycérique a été démontrée par EMBDEN (63) qui, ajoutant cet acide à une purée musculaire en anaérobiose, obtenait son dédoublement en acide phosphorique et acide pyruvique, non par hydrolyse, mais par arrachement.

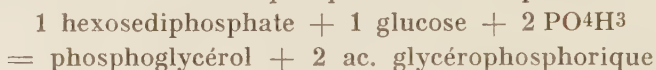
D'autre part, le fluorure de sodium ajouté à un extrait de muscle contenant de l'acide phosphopyruvique empêche sa déphosphorylisation de sorte que, la dégradation du glucose se trouve arrêtée puisque les esters hexosephosphoriques ne peuvent plus se reformer aux dépens de l'acide phosphorique qui devrait être libéré.

Enfin, l'acide pyruvique est réduit en acide lactique. Cette réaction est d'ailleurs couplée avec la réoxydation du phosphoglycérol en phosphoglyceraldéhyde. On est donc, là encore, en présence d'un processus d'oxydoréduction.

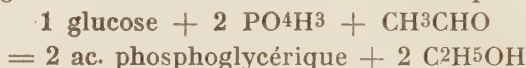
Une objection sérieuse à ce schéma a longtemps subsisté : c'est que la vitesse des réactions intermédiaires que nous venons d'étudier prises isolément, est plus grande que la vitesse de dégradation du glucose. C'est ainsi que l'ester de HARDEN et YOUNG fermente trente fois moins vite que le glucose ; de même, l'acide glycérophosphorique et l'acide phosphopyruvique ont une vitesse de dégradation qui est environ 7 fois plus faible que celle du glucose. Il semblait donc impossible d'admettre que la fermentation totale du glucose puisse donner naissance à ces corps. Mais MEYERHOF, en 1936, a démontré

que leur vitesse de fermentation est considérablement augmentée en présence de glucose. A ce sujet, MEYERHOF expose une conception nouvelle de la fermentation alcoolique par la levure de bière.

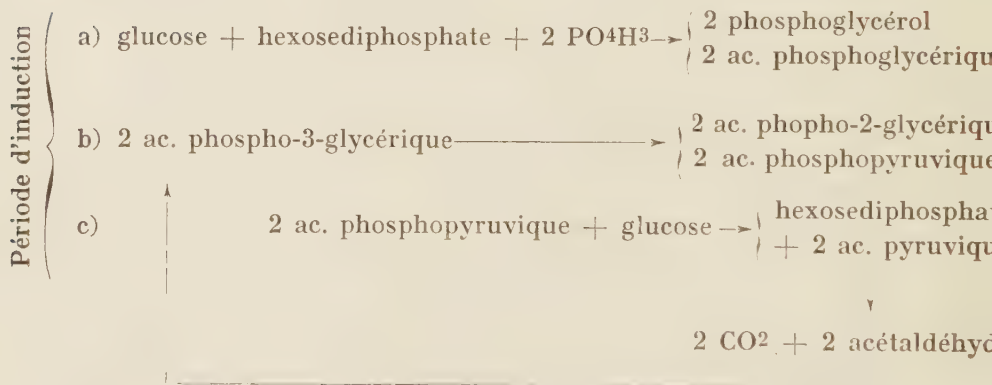
Si, dans un extrait de levure fluorée, on ajoute de l'ester de HARDEN et YOUNG, il se forme du phosphoglycérol et de l'acide glycérophosphorique. Si on ajoute du glucose, celui-ci déclenche une nouvelle formation de ces corps jusqu'à épuisement total de l'hexosediphosphate selon l'équation :



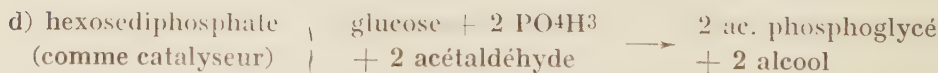
On a là une première période de la dégradation du glucose dite période d'induction. Si on ajoute alors de l'acétaldéhyde, l'excès de glucose fermente à son tour selon l'équation :



On a donc, d'après MEYERHOF, le schéma suivant :



Période d'état



Il est évident que ces observations sur la levure permettent d'envisager un mécanisme similaire dans la fermentation lactique de l'extrait de muscle.

La question qui se pose maintenant est de savoir s'il en est

de même *in vivo* dans le muscle au repos. Il est permis de l'admettre. En effet, si on ne s'adresse plus à un jus de presse musculaire, mais à un muscle entier qu'on prélève et isole dans des conditions rigoureuses d'asepsie pour l'abandonner à l'autolyse, on constate également la transformation du glycogène en acide lactique, l'hydrolyse de l'acide adénylpyrophosphorique, la diminution du phosphore inorganique du milieu, la formation d'esters hexosephosphoriques, etc. Tous les résultats acquis au moyen des solutions de ferment musculaire se retrouvent dans le muscle intact. Ainsi, rien ne s'oppose à ce qu'on étende au muscle vivant au repos, le processus de dégradation que nous venons de décrire.

II. — Métabolisme des glucides dans le muscle au travail. Biochimie de la contraction

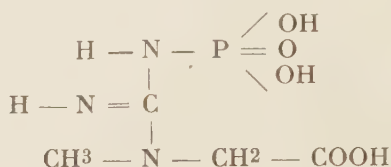
Pour étudier commodément les réactions qui se produisent à l'intérieur d'un muscle en contraction ou après contraction, les physiologistes ont dû opérer sur le muscle isolé de l'animal.

Ils se sont adressés de préférence aux muscles de poïkilothermes aisément maintenus en survie et qui présentent le gros avantage de permettre l'évaluation exacte du bilan chimique. Toute circulation étant interrompue, le sang ne peut amener de réserves ni drainer de produits de déchet, ce qui assure une suffisante exactitude aux résultats. La contraction peut se faire en aérobiose ou en anaérobiose.

1° LA CONTRACTION EN ANAÉROBIOSE

Depuis NASSE (1879) (192), on sait qu'un muscle peut se contracter en l'absence d'oxygène et qu'il s'y accumule, dans ces conditions, de l'acide lactique en quantité équivalente au glycogène disparu. On ne s'est pas trop préoccupé d'établir le

mécanisme de la formation de l'acide lactique jusqu'à la découverte dans le muscle de l'acide créatinephosphorique :



En 1927, EGGLETON et EGGLETON (58) étudiant le phosphore du muscle de grenouille, constataient que la teneur en phosphore minéral peu élevée dans l'extrait frais augmentait sensiblement après un contact d'une demi-heure de cet extrait avec un acide faible. Elle doublait au bout de ce temps avec un extrait de muscle fatigué et quadruplait avec un extrait de muscle reposé. Ces auteurs conclurent que le muscle contenait une combinaison phosphorique instable à laquelle ils donnèrent le nom de phosphagène.

La même année, FISKE et SUBBAROW (73) isolaient du muscle du chat, sous forme de sel de calcium, une combinaison instable en milieu acide de créatine et d'acide phosphorique que les EGGLETON identifièrent aussitôt avec leur phosphagène (59). C'est l'acide créatine-phosphorique.

En milieu acide, ce corps s'hydrolyse très facilement en créatine et acide phosphorique, avec libération de 11 calories par molécule.

De nombreux auteurs ont depuis étudié cette hydrolyse au cours des contractions musculaires. NACHMANN SOHN (191) montra qu'il existe une relation entre la vitesse de contraction d'un muscle et la vitesse d'hydrolyse de l'acide créatine-phosphorique. L'hydrolyse se produit seulement pendant la période de contraction (NACHMANN SOHN, LEHNARTZ) (142) (143). On admet à l'heure actuelle que c'est l'hydrolyse exothermique de l'acide créatine-phosphorique qui fournit à elle seule une quantité d'énergie suffisante pour déclencher la contraction.

LUNDGAARD (158) fut amené à constater que sur des muscles énervés préalablement et inhibés par l'acide monoiodacé-

tique, l'acide créatine-phosphorique s'hydrolyse complètement. Il ne se forme pas d'acide lactique mais il s'accumule des esters hexose-phosphoriques en quantité équivalente à l'acide phosphorique libéré.

EGGLETON et EGGLETON confirmèrent, au cours de la contraction, la formation d'esters hexosephosphoriques qui sont précisément l'ester hexose-monophosphorique d'EMBDEN et l'ester hexose-di-phosphorique de HARDEN et YOUNG. La formation de ces corps est la seconde étape des phénomènes chimiques qui accompagnent la contraction musculaire. Leur dégradation mène ensuite à la formation d'acide lactique. On a montré, en effet, qu'au cours des contractions, l'acide lactique s'accumulait dans les muscles jusqu'à un certain pH pour lequel le muscle devient inexcitable. D'autre part, MEYERHOF a établi que l'acide lactique apparu au cours de la contraction est équivalent à la quantité de glycogène disparu. LUNDGAARD a également prouvé l'équivalence de la quantité d'esters phosphoriques formés dans un muscle intoxiqué par l'acide monoiodacétique avec les quantités respectives de glycogène et d'acide créatine-phosphorique disparus. Il est donc probable que la formation de l'acide lactique se fait, comme dans la dégradation du glycogène dans le muscle au repos, à partir des esters hexosephosphoriques. Cette probabilité est encore confirmée par la formation d'une certaine quantité d'acide phosphorique accompagnant celle de l'acide lactique.

Par ailleurs, EMBDEN, en 1924 (63) a montré que pendant les 30 secondes suivant la fin de la contraction, il continuait à se former des quantités notables d'acide lactique. On admet aujourd'hui que 50 % de l'acide lactique se forment après la fin de la contraction, et que sa formation générale produit une quantité d'énergie suffisante pour assurer la resynthèse de l'acide créatine-phosphorique aux dépens de ses produits d'hydrolyse. En effet, si cette réaction est endothermique et nécessite l'apport de 11 calories, la formation d'acide lactique à partir du glycogène est, nous l'avons vu au début de ce chapitre, exothermique et comporte un dégagement de 24 calories.

Il a d'ailleurs été constaté que dans les muscles normaux, de

l'acide créatine-phosphorique se reforme dès la fin de la contraction alors qu'il continue à s'accumuler de l'acide lactique. Il n'y a, en tout cas, pas resynthèse totale, celle-ci n'étant possible, comme on le verra, qu'en aérobiose.

Que devient l'acide adénylpyrophosphorique qui joue un si grand rôle dans le muscle au repos ?

Quand les contractions ne sont ni fortes ni prolongées, son taux ne varie pas sensiblement ; au contraire, si elles deviennent violentes et nombreuses, l'acide adénylpyrophosphorique diminue et la teneur en ammoniacque augmente. Cette augmentation correspond d'ailleurs à la quantité d'adénine transformée en hypoxanthine lors de l'hydrolyse de l'acide adénylpyrophosphorique. Il est donc possible d'admettre que cette hydrolyse se produit.

Au cours des contractions peu nombreuses, on suppose que l'acide adénylpyrophosphorique est reformé au fur et à mesure de son hydrolyse, ce qui explique la constance de son taux. Pour EMBDEN, cette resynthèse se fait aux dépens des produits d'hydrolyse, tandis que pour PARNAS (210) la resynthèse de l'hypoxanthine du groupe inosique se fait au moyen des acides aminés ; cette dernière opinion semble prévaloir puisqu'au cours des contractions peu nombreuses, on ne peut jamais mettre en évidence la présence de l'ammoniacque.

2° LA CONTRACTION EN AÉROBIOSE

Si l'anaérobiose subsiste, le muscle devient rapidement inexcitable. Par contre, un apport d'oxygène lui permet de se contracter à nouveau. C'est que l'oxydation qui se produit permet les resynthèses complètes des acides créatine-phosphorique et adénylpyrophosphorique. De plus, l'acide lactique disparaît. On peut donc penser qu'il y a une resynthèse du glycogène.

MEYERHOF s'est efforcé de démontrer cette hypothèse. Il a mesuré systématiquement les quantités d'oxygène consommé et d'anhydride carbonique produit ainsi que les variations du taux de l'acide lactique et du glycogène, pendant les heures qui

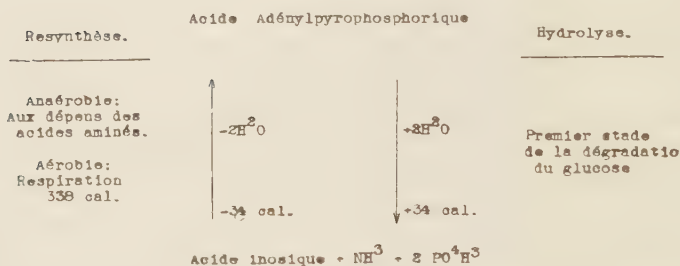
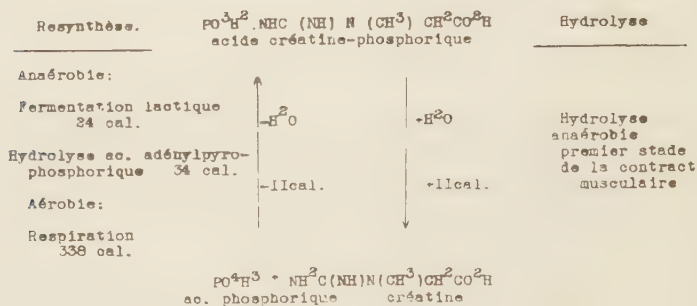
suivent une série de contractions. Il est ainsi arrivé à démontrer que les trois quarts de l'acide lactique produit pendant la contraction reforment du glycogène pendant la longue période dite de restitution en aérobiose (171).

Notons qu'au cours du travail musculaire, il y a passage dans le sang d'une faible quantité d'acide lactique qui reforme du glycogène dans le foie. Il y aurait ainsi, entre le muscle et le foie, un cycle fermé, ce glycogène hépatique étant restitué au muscle par le sucre sanguin. Mais si l'acide lactique passe pour une faible part dans le sang, si d'après MEYERHOF, les trois quarts reforment du glycogène, il doit en rester cependant suffisamment dans le muscle après un travail prolongé, pour qu'on puisse vérifier son accumulation.

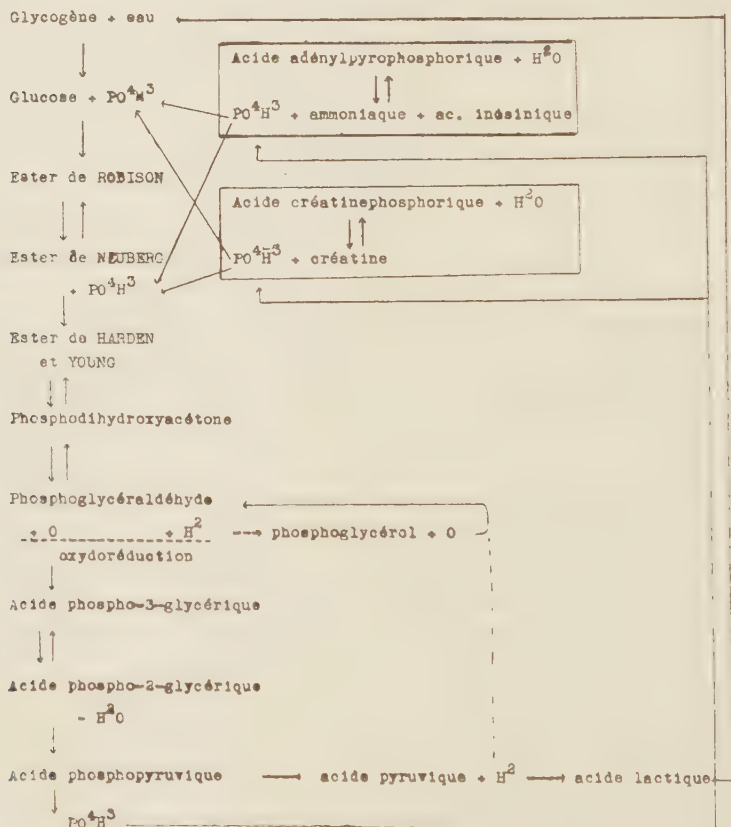
Or, HOUGET (105) après avoir soumis le vaste externe du chien à un travail intense et prolongé ne note jamais d'augmentation de sa teneur en acide lactique. Bien plus, il enregistre toujours une diminution. Il est donc logique d'admettre qu'une partie de l'acide lactique est également brûlée *in situ*.

Précisons maintenant les cycles si importants de l'acide créatine-phosphorique et de l'acide adénylpyrophosphorique, lesquels ne sont pas complètement indépendants l'un de l'autre. Dans la purée de muscle contenant de la créatine et de l'acide phosphorique, on a en effet constaté que l'addition d'acide adénylpyrophosphorique détermine la synthèse d'acide créatine-phosphorique aux dépens de l'hydrolyse du pyrophosphate. Ainsi, l'acide adénylpyrophosphorique jouerait un rôle de transporteur de phosphore, d'une part dans la dégradation des glucides, d'autre part dans la resynthèse anaérobie de l'acide créatine-phosphorique.

Nous reproduisons ci-dessous le schéma de ces deux cycles que nous empruntons presque entièrement à GENEVOIS (91) :



A la suite de cet exposé, il devient possible de dresser le schéma général du métabolisme des glucides dans le muscle :



Pour clore ce chapitre, nous rappellerons ce qui est connu des variations de composition du muscle au cours du travail, nous limitant aux principales substances qui participent au métabolisme des glucides.

Cette question a été remarquablement étudiée par CAHN et HOUGET (29) sur le vaste externe du chien. Remarquons en passant qu'il ne s'agit plus ici d'un muscle de poïkilotherme, mais d'homéotherme. Ces auteurs trouvent qu'après un travail musculaire intense et prolongé, la teneur en composés réducteurs glucidiques diminue ainsi que celle de l'acide lactique.

Ils constatent également la diminution et parfois la disparition presque complète de l'acide créatine-phosphorique ainsi que la diminution de l'acide adénylpyrophosphorique. Sur ce dernier point, ils se montrent en désaccord avec d'autres auteurs. La divergence des résultats s'expliquerait par la fragilité de resynthèse de cet acide.

Pour les esters hexosephosphoriques, CAHN et HOUGET notent aussi bien des augmentations que des diminutions. Comme tous les auteurs, ils observent une augmentation importante des orthophosphates. Enfin, ils trouvent que le phosphore total ne varie pratiquement pas, ce qui prouve, disent-ils, qu'au cours des contractions musculaires, les échanges de composés phosphoriques entre le muscle et le sang sont peu importants.

Nous nous proposons de poursuivre une étude du même genre non plus au cours de la contraction, mais au cours de diverses carences, celles-ci ayant un retentissement rapide et direct sur les divers phénomènes de la nutrition. Avant d'entrer dans le vif du sujet, nous nous devons de faire un exposé critique des diverses techniques mises en œuvre et parmi lesquelles nous préciserons celles qui nous ont paru le mieux correspondre à l'appréciation du taux des principales substances qui participent à la dégradation des glucides dans le muscle.

CHAPITRE II

ETUDE CRITIQUE DES TECHNIQUES DE DOSAGE DES PRINCIPALES SUBSTANCES INTERVENANT DANS LE METABOLISME GLUCIDIQUE DU MUSCLE.

Dans ce chapitre, nous déterminerons la valeur respective des différentes méthodes de dosages proposées pour apprécier le taux des composés réducteurs glucidiques totaux, de l'acide lactique, des principaux composés phosphoriques et du phosphore total acidosoluble.

I. — Etude critique des méthodes de dosage des composés réducteurs glucidiques totaux

Que convient-il d'entendre par composés réducteurs glucidiques totaux du muscle ? Qu'englobe exactement leur dosage ?

Pour CAHN, HOUGET et JACQUOT (30), ce dosage comporte la mesure du pouvoir réducteur après défécation tungstique d'une liqueur d'hydrolyse musculaire faiblement acide étant restée en contact avec le muscle pendant une durée suffisante à 100°. Le pouvoir réducteur de la liqueur, apprécié par la technique de FONTES et THIVOLLE (77) est ensuite exprimé en glucose.

Examinons ce qui peut se trouver réellement dosé par cette méthode en recherchant l'effet de l'hydrolyse sur la composition chimique du muscle puis en passant en revue les divers

modes de défécation et de dosage qui pourraient être employés. Il sera possible alors de nous faire une opinion et d'adopter ou non la manière de voir de CAHN, HOUGET et JACQUOT.

Ces auteurs emploient pour l'hydrolyse, une solution d'acide sulfurique à 1 % et ils y maintiennent le muscle à 100° pendant trois heures. Ceci a pour but d'hydrolyser complètement le glycogène en glucose. Mais on peut se demander si dans de telles conditions, à côté du glycogène qui est quantitativement le plus important, d'autres composés ne sont pas, eux aussi, hydrolysés plus ou moins partiellement avec libération de glucose.

Nous avons étudié, dans le chapitre premier, l'hydrolyse des esters hexosephosphoriques en milieu chlorhydrique normal et l'examen des courbes de LOHMANN nous montre que si les esters de HARDEN et YOUNG et de NEUBERG sont hydrolysés en trois heures, respectivement dans les proportions de 87 et 75 %, les autres le sont beaucoup moins. Comme nous ne sommes ici qu'en milieu sulfurique à 1 %, il est probable que l'hydrolyse de tous ces esters est très faible et que finalement la proportion de glucose qui en résulte est infime vis-à-vis du glucose glycogénique. Indépendamment de ce que la liqueur déféquée peut encore contenir de protides réducteurs (nous reviendrons sur ce point très important) elle contient encore des substances réductrices de nature glucidique autres que le glucose. Les esters hexosephosphoriques ont précisément un pouvoir réducteur qui leur est propre. Il a été étudié par MEYERHOF et LOHMANN (174) qui l'ont mesuré par la méthode de G. BERTRAND (18).

Ces auteurs ont montré, par exemple, que le pouvoir réducteur des esters de ROBISON ou d'EMBDEN est égal à 80 % de celui du glucose, celui de l'ester de HARDEN et YOUNG n'atteignant que 42 %. Ainsi, la portion non hydrolysée des esters hexosephosphoriques contribue également au pouvoir réducteur de l'extrait de muscle.

Les triosephosphates, phosphodihydroxyacétone et phosphoglyceraldéhyde qui représentent, nous l'avons vu, l'échelon suivant de la dégradation, n'ont pas été systématiquement étudiés quant à la mesure de leur pouvoir réducteur. Il est permis

en tout cas de supposer qu'ils doivent eux aussi, être plus ou moins hydrolysés pour donner les oses réducteurs correspondants.

L'acide adénylpyrophosphorique contient dans son groupe adénylique, du ribose. Il est possible que ce glucide réducteur soit libéré, tout au moins en partie, au cours d'une hydrolyse de trois heures.

POWER et CLAWSON (214) ont cherché à distinguer dans l'extrait alcoolique du muscle, les substances fermentescibles par la levure de celles qui ne le sont pas. L'extrait alcoolique du muscle de lapin a donné de 0,03 à 0,05 % de substances réductrices non fermentescibles. On voit donc, en définitive, que si le pouvoir réducteur du filtrat de déprotéinisation est dû surtout au glucose glycogénique, il est également dû, mais pour une faible part, au glucose provenant d'autres combinaisons et même à d'autres oses que le glucose.

Nous n'avons du reste envisagé jusqu'alors que le muscle de l'animal normal. Or, il est possible de constater au cours de certaines carences ou déséquilibres alimentaires, une telle augmentation du pouvoir réducteur, qu'on puisse admettre que des substances réductrices étrangères au métabolisme glucidique naturel du muscle interviennent dans ce cas. Nous reviendrons sur ce point .

Les réactifs déféquants, l'acide tungstique employé par FONTES et THIVOLLE en particulier, assurent-ils une élimination complète des substances réductrices de nature protidique ?

D'après DUMAZERT (56), la pulpart des filtrats sanguins obtenus par les réactifs courants de déprotéinisation contiennent une proportion notable de substances de nature non glucidiques mais capables de réagir sur le réactif oxydant mis en jeu pour doser le glucose. Il est bien évident que ceci doit s'appliquer également à une liqueur d'hydrolyse musculaire.

Parmi ces corps, nous trouvons l'acide urique et la créatinine dont le rôle perturbateur est certainement plus important dans le muscle que dans le sang, car elle s'y trouve en plus grande quantité (CAHN et HOUGET donnent 22 à 29 mgr. pour

100 gr. dans le muscle et 0,6 à 2,2 mgr. pour 100 gr. dans le sang du chien).

Nous trouvons aussi des composés organiques soufrés dans lesquels le soufre est dit neutre. Le plus important de ces corps est le glutathion qui, par ses propriétés réductrices bien connues, peut être une cause d'erreur .

Pour BAUDOIN (15) s'il est difficile de se débarrasser des composés soufrés, la défécation mercurielle élimine complètement les corps azotés des filtrats, ce que ne fait pas l'acide tungstique qui laisse passer la créatinine et peut-être les nucléotides.

FONTES et THIVOLLE (78), par ailleurs, ont systématiquement étudié le pouvoir réducteur des filtrats sanguins de défécation mercurielle et tungstique. Cette étude leur a fait admettre l'existence d'une substance réductrice rapidement fermentescible que précipite le nitrate mercurique mais que respecte l'acide tungstique. Elle répond à un glucide indéterminé qu'ils nomment glucide X. Il est possible qu'il en soit de même dans le muscle et il nous a paru logique en abordant son étude au cours des diverses carences, de choisir un réactif de déprotéinisation qui laisse passer le maximum de substances glucidiques, quitte à ne pas retenir intégralement toutes les substances azotées ou soufrées. C'est pourquoi, l'acide tungstique proposé par FONTES et THIVOLLE a retenu notre attention. Il nous reste à voir si les inconvénients qu'il présente peuvent être éliminés par le choix judicieux d'une technique de dosage et, si en particulier, la technique proposée par ces mêmes auteurs satisfait à ce choix .

Il n'est pas question d'employer ici une macrométhode puisque les muscles des animaux de laboratoire que nous étudierons contiennent en moyenne 150 à 200 mgr. de composés réducteurs glucidiques pour 100 gr. de muscle frais et qu'on dispose en général de 5 à 10 gr. de muscle.

Nous examinerons donc les microméthodes ou semimicrométhodes de dosage des glucides qui sont d'ailleurs d'un usage courant puisqu'elles servent à la mesure de la glycémie.

La plupart de ces techniques consistent à oxyder le glucide en milieu alcalin et à chaud. Or, les glucides résistent mal à

l'action des alcalis. On sait par exemple, que le glucose mis en présence de soude et à froid, se transforme partiellement en mannose ; à chaud, cette réaction devient plus rapide et la chaîne carbonée est coupée. On assiste alors à une dégradation comparable à celle que nous avons étudiée dans le muscle, peut-être beaucoup plus complexe. NEF (193) serait parvenu à caractériser 113 corps et il pense qu'il doit en exister davantage !

Quoi qu'il en soit, des corps à fonction aldéhydique ou cétonique prennent naissance au cours de cette dégradation ; leur pouvoir réducteur n'est pas le même spécifiquement que celui du glucose et dépend en outre, de leur concentration dans le milieu. Cette concentration varie à chaque instant et dépend de la température et du degré d'alcalinité .

On voit donc que pour obtenir des résultats comparables avec des techniques de ce genre, il faut fixer d'une manière absolument rigoureuse, les conditions de durée, de température et d'alcalinité du milieu.

Il y a cependant une technique qui échappe complètement à cet empirisme. C'est celle de notre maître le professeur BOUGAULT (23) qui a été adaptée récemment à la mesure de la glycémie par DUMAZERT (56). Elle est basée sur le fait suivant : l'iode en milieu alcalin et à froid oxyde les aldoses en acides uroniques.

Le principe de cette méthode conduit, on le voit, à une équation d'oxydation bien définie dans laquelle la structure de la molécule glucidique est respectée. De plus, fait très intéressant, le dosage est spécifique des aldoses, les cétooses n'étant pratiquement pas attaqués par l'iode dans les conditions déterminées par l'auteur.

L'intérêt que peut présenter une méthode aussi sélective est à retenir. Mais pour le moment, alors qu'il s'agit de défricher la question des glucides musculaires au cours des carences ou des déséquilibres alimentaires, nous avons vu qu'il importait surtout de doser le bloc glucidique. Ce bloc, nous l'estimons volontairement de la façon la plus large, par le choix de l'acide tungstique comme réactif déféquant.

Il y aurait, par ailleurs, ultérieurement un travail différent

à entreprendre qui pourrait avoir pour objet la comparaison du bloc-aldoles avec les blocs glucidiques provenant respectivement de défécations tungstiques et mercurielles.

Parmi les techniques restant à notre disposition, la plus classique est incontestablement celle de G. BERTRAND. On l'utilise couramment sur le sang et surtout sur l'urine. Elle consiste à faire bouillir la liqueur déféquée à titrer, avec un excès de liqueur cupropotassique et à recueillir l'oxydule de cuivre sur un filtre d'amiant. Cet oxydule est alors traité par une solution acide de sulfate ferrique qui est partiellement réduite à l'état ferreux, proportionnellement à la quantité d'oxydule mis en jeu.



On n'a plus qu'à doser le sulfate ferreux formé au moyen d'une solution titrée de permanganate pour en déduire la quantité de cuivre à laquelle il correspond. Une table dressée par l'auteur donne par simple lecture le poids du glucose correspondant.

Cette technique qui est d'ailleurs généralement associée à une défécation mercurielle, est une semimicrométhode difficilement compatible avec les prises d'essai dont nous disposons.

Sur les petits animaux de laboratoire, nous serons souvent amenés à ne disposer que d'une prise d'essai de 5 gr. de muscle frais, ce qui représente une dose de glucides de l'ordre de 10 mgr. Comme nous désirons opérer sur une portion aliquote du filtrat de défécation afin d'éviter le lavage fastidieux du précipité et aussi pour nous réserver un deuxième essai, la méthode de G. BERTRAND nous paraît insuffisante. (La table de BERTRAND concernant le glucose ne commence en effet qu'à 10 mgr. de ce glucide).

Divers auteurs ont bien essayé de faire de la méthode de BERTRAND une microméthode. MICHAELIS (175) notamment, dose avec sa technique, des quantités de glucose allant de 0 mgr. 39 à 1 mgr. 31. Il centrifuge l'oxydule à 2.000 tours minute et filtre sur amiant en utilisant un appareil semblable à celui de BERTRAND, mais de dimensions réduites. A notre

avis, cette façon d'opérer demande des précautions par trop minutieuses pour recueillir l'oxydule sans la moindre perte.

La méthode de LEWIS et BENEDICT (149) est vraiment une microméthode puisqu'elle met en jeu une solution étalon contenant 0 mgr. 64 de glucose. Elle est basée sur le principe suivant : le glucose en présence d'un alcalin et de l'acide picrique, donne à l'ébullition une coloration dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucose présente dans la réaction. Mais si on utilise un déféquant qui laisse passer la créatinine, cette méthode est absolument impossible à employer en raison du picrate rouge de créatinine qui se forme et qui fausse considérablement la colorimétrie (S. MORGULIS et H.-M. IAHR) (182).

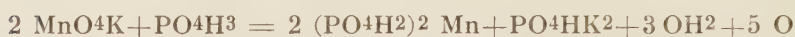
La méthode de FOLIN et WU (76) est aussi une microméthode susceptible de nous intéresser puisqu'elle utilise des tubes étalon contenant de 0 mgr. 05 à 0 mgr. 04 de glucose. Elle repose sur ce principe que l'oxydule cuivreux formé dans l'action du glucose sur un sel cuivrique, en solution tartroalcaline, se dissout dans un réactif à base d'acide tungstique et molybdique en développant une coloration bleue proportionnelle à la quantité de sucre qui lui a donné naissance. Elle permet d'employer divers réactifs de déprotéinisation au choix : acide tungstique, acide picrique ou acide métaphosphorique.

La technique originale comporte l'emploi de 5 tubes étalon correspondant à des doses régulièrement échelonnées entre 0,05 et 0,4 mgr. de glucose. La comparaison colorimétrique doit se faire en effet, dans des limites assez étroites car la proportionnalité entre le glucose présent et la coloration développée n'est pas rigoureuse.

Pour remédier à cet inconvénient, GUILLAUMIN a publié une table qui donne les quantités de glucose correspondant à des hauteurs colorimétriques différentes, pour un seul tube étalon.

FONTES et THIVOLLE ont modifié la méthode de FOLIN et WU d'une façon élégante en la rendant plus précise. Ils isolent le précipité d'oxydule cuivreux par centrifugation (cette centrifugation est d'ailleurs facilitée par l'enrobage de l'oxydule dans un précipité de carbonate de magnésie). Puis ils le dissolvent immédiatement dans un réactif où il n'entre plus de

tungstène, un réactif phosphomolybdique qui se trouve réduit de la façon suivante : l'anhydride molybdique MoO_3 est réduit en oxyde de molybdène MoO_2 proportionnellement à la quantité d'oxydure cuivreux mise en jeu. Mais au moment même de sa formation, cet oxyde molybdeux se combine avec l'anhydride molybdique non réduit et une partie de l'acide phosphorique ambiant, pour fournir le phosphoconjugué céruloé-molybdique $[4(\text{MoO}_3) \text{ MoO}_2]_2 \text{ PO}_4\text{H}_3$ isolé et décrit par DENIGES. $10 \text{ MoO}_3 + 2 \text{ Cu}_2\text{O} + \text{PO}_4\text{H}_3 = [4(\text{MoO}_3) \text{ MoO}_2]_2 \text{ PO}_4\text{H}_3 + 4 \text{ CuO}$ Ce composé colore intensément en bleu la liqueur, mais au lieu de faire un dosage colorimétrique, FONTES et THIVOLLE réoxydent sa copule MoO_2 par une solution étendue de permanganate de potassium jusqu'à décoloration. Comme en maganimétrie ordinaire, 2 molécules de permanganate interviennent en libérant 5 atomes d'oxygène.



et l'oxygène libéré agit sur le phosphoconjugué selon l'équation :



Ce procédé a donc l'avantage de substituer à une lecture colorimétrique, un titrage à la burette toujours plus précis. Deux tubes suffisent : un tube analyse et un tube étalon qui contient 1 mgr. de glucose. Voilà qui est tout à fait compatible avec la teneur moyenne en glucides de nos prises d'essais.

La technique de FONTES et THIVOLLE est-elle compatible avec la défécation tungstique ? Nous avons vu que les seuls inconvénients sérieux pour nous d'un tel mode de déprotéinisation étaient de laisser passer dans le filtrat la créatinine, les nucléotides et le glutathion.

Or, d'après FONTES et THIVOLLE, la créatinine n'influence sensiblement pas les liqueurs cuproalcalines. Par ailleurs, J. ROCHE (244) étudiant la participation des corps phosphorés au pouvoir réducteur du sang a constaté que les nucléotides n'influencent pas cette méthode.

D'après BAUDOIN, les composés soufrés comme le glutathion

ne réduiraient pas les liqueurs cuproalcalines, il se formerait à chaud du sulfure de cuivre. En revanche, ils réduisent l'acide molybdique et le permanganate de potasse. C'est un inconvénient si on emploie la méthode de FOLIN et WU. Il disparaît avec celle de FONTES et THIVOLLE qui ont pris soin d'isoler par centrifugation le précipité d'oxydure cuivreux avant de le dissoudre dans la liqueur molybdique. On pourra objecter qu'il est mal lavé (car on n'a pas le temps de le laver, il se réoxyderait ou se recentrifugerait mal), mais ce n'est pas la dose infime de glutathion qu'il peut emprisonner entre ses grains qui faussera le dosage.

Enfin, CAHN, HOUGET et JACQUOT (30) défendent la méthode de FONTES et THIVOLLE qu'ils ont choisie en déclarant que la créatinine, l'acide urique, le glutathion, etc. dans les concentrations où on les trouve dans le sang, le muscle et même le foie, ne perturbent nullement le dosage.

La méthode de HAGEDORN-JENSEN (94) si en vogue, ajoutent-ils est beaucoup moins spécifique.

Cette technique est le type parfait de la microméthode puisqu'elle permet, lorsqu'elle est appliquée à la glycémie, d'opérer avec 0 cc. 1 de sang. Elle est basée sur le principe suivant : Le glucose en milieu alcalin réduit le ferricyanure de potassium en ferrocyanure. On opère avec un excès de ferricyanure et c'est cet excès qu'on dose par l'acide iodhydrique qui le réduit lui aussi en ferrocyanure, mais avec dégagement d'iode. C'est précisément l'iode qui est dosé en fin de compte par l'hypo-sulfite et on en déduit la quantité de ferricyanure disparu et partant celle de glucose. Les auteurs ont d'ailleurs dressé une table permettant de passer directement du nombre de centimètres cubes d'hypo-sulfite versés à la quantité de glucose. Ils donnent, en outre, un mode opératoire extrêmement précis et détaillé qu'il faut suivre à la lettre. FONTES et THIVOLLE (77) prétendent en effet que « l'inobservation d'une seule des multiples conditions exigées par les auteurs amène des erreurs de l'ordre de 50 % ».

Enfin, citons pour terminer, la méthode de BANG qu'on est

en droit d'appeler ultramicrométhode puisqu'elle permet d'opérer en glycémie sur une goutte de sang .

Dans une première technique, BANG (13) utilisait le principe suivant : le sulfate de cuivre, en solution avec du bicarbonate, du carbonate et du chlorure de potassium, mis en présence d'un sucre réducteur, reste coloré à la chaleur et l'oxydule cuivreux formé ne précipitant pas, se réoxyde très facilement, soit par l'air, soit d'une façon rapide et complète par une solution d'iode titrée. Lorsqu'il n'y a plus de sous-oxyde, l'iode colore en bleu l'empois d'amidon qu'on aura introduit dans le milieu. Gêné par l'action de l'air, BANG (14) dut abandonner ce procédé et mit au point sa deuxième microméthode dont H. LABBE et F. NEPVEUX poussèrent l'étude à fond.

Cette fois l'oxydation de l'oxydule cuivreux est réalisée par l'acide iodique en excès, en milieu acide, et on titre cet excès en présence d'un iodure alcalin par l'hyposulfite. On dose ainsi avec beaucoup d'exactitude des quantités de glucose inférieures à 0 mgr. 1.

BANG utilise sur le sang un réactif déféquant à base d'acétate d'urane, de chlorure de potassium et d'acide chlorhydrique. THEPENIER (263) a d'ailleurs fait des dosages en utilisant divers déféquants. Il a montré que c'est le réactif de BANG qui laisse passer la plus petite quantité de substances réductrices dans le filtrat, le PATEIN la plus grande, il n'a pas essayé l'acide tungstique.

Ce même auteur a, par ailleurs, perfectionné l'appareillage qui est délicat et assez compliqué.

Pour nous, qui disposons de prises d'essais musculaires de quelques grammes et dont la teneur en glucides se trouve, par suite, infiniment supérieure à celle de quelques gouttes de sang, les techniques de HAGEDORN-JENSEN et de BANG sont loin d'être indispensables. Comme elles sont très délicates, nous préférons les éliminer de notre choix.

En résumé, nous désirons employer l'acide tungstique comme déféquant parce qu'il laisse passer le maximum de glucides, mais en revanche, il laisse aussi passer quelques composés azotés comme la créatinine, les nucléotides et des composés

soufrés comme le glutathion qui peuvent nous gêner. Nous rejetons la méthode de BERTRAND qui s'accommode habituellement d'une défécation mercurielle et que nous trouvons trop délicate lorsqu'elle est transformée en microméthode .

Nous rejetons la méthode de LEWIS et BENEDICT qui ne convient pas du tout à un déféquant qui laisse passer la créatinine.

Nous rejetons la méthode de FOLIN et WU qui ne s'accommode pas d'un déféquant qui laisse passer le glutathion.

Nous rejetons les méthodes de BANG et de HAGEDORN-JENSEN qui utilisent des prises d'essais bien inférieures à celles dont nous pouvons disposer.

Nous adoptons la technique de FONTES et THIVOLLE dont la sensibilité est parfaitement compatible avec les prises d'essai dont nous disposons et qui n'est influencée ni par la créatinine ni par les nucléotides ni par le glutathion.

II. — Etude critique des méthodes de dosage de l'acide lactique

A. — NÉCESSITÉ D'UNE FIXATION PRÉALABLE

Avant d'entreprendre la défécation de l'échantillon musculaire destiné au dosage de l'acide lactique, il importe d'éliminer toute action fermentaire susceptible de modifier le taux de cet acide. C'est pourquoi, de nombreux auteurs, notamment FLETCHER et HOPKINS (74), EMBDEN, MEYERHOF (173), CAHN et HOUGET conseillent de prélever rapidement le muscle et de le fixer à 0° ou au-dessous, le froid ayant pour effet de paralyser toute action diastasique intervenant dans la fermentation lactique.

Cependant, SHARP (250) a constaté une diminution du glycogène en relation avec une accumulation de l'acide lactique dans les muscles de poissons « post-mortem » à basses températures. La glycogénolyse atteindrait son taux maximum en-

tre $-3^{\circ}2$ et $-3^{\circ}7$. De plus, on observerait, au moment du dégel, une production rapide d'acide lactique (entre -2° et $-1^{\circ}6$). Personnellement, nous avons tenu à préciser la nécessité de fixer rapidement le muscle. Pour cela, nous avons produit la fixation des masses pectorales musculaires du pigeon après des durées d'abandon régulièrement croissantes à la température du laboratoire. Nous y avons dosé chaque fois l'acide lactique. Nos résultats consignés dans le tableau qui suit nous ont permis d'établir une courbe d'imprégnation lactique en fonction du temps.

Durée d'abandon en minutes	Acide lactique en mgr. pour 100 gr.
0	194
20	203
40	220
60	244
80	270

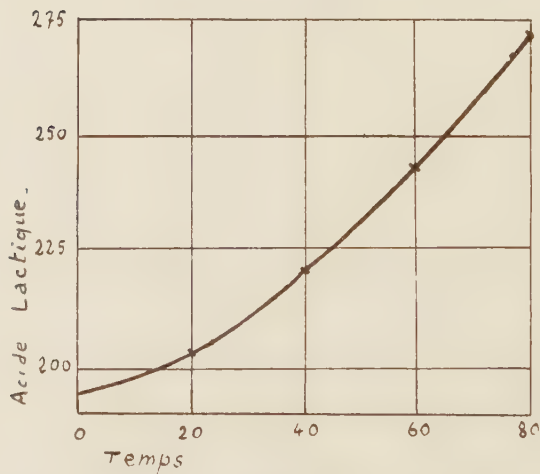


FIG. 5. — Courbe d'imprégnation lactique *post-mortem* du muscle de pigeon, en fonction du temps.

Cette courbe confirme la nécessité d'opérer rapidement une fixation que nous avons produite à l'exemple de CAHN et HOUTGET, en milieu sulfurique à 2 %. Bien que les observations de SHARP n'indiquent pas une élévation très notable du taux de l'acide lactique même aux températures qu'il donne comme critiques, nous avons décidé cependant d'opérer à une température nettement inférieure, -5° , que nous maintenons pendant 4 à 5 heures. Au bout de ce temps, le milieu est brutalement dégelé à 100° pour limiter à une durée absolument négligeable le passage aux températures favorables à la formation d'acide lactique. La défécation doit ensuite être immédiate.

B. — DÉFÉCATIONS ET DOSAGES

L'isolement de l'acide lactique du muscle sous forme de lactate de zinc était la seule méthode d'analyse quantitative employée autrefois. FLETCHER et HOPKINS (74). Elle exigeait pour être précise, des prises d'essai considérables. Aussi n'est-elle plus utilisée que comme méthode de contrôle.

De même que nous avons choisi une méthode de dosage des glucides parmi les méthodes en usage pour la mesure de la glycémie, de même il nous semble logique de fixer notre choix parmi les méthodes concernant la lactacidémie. Ces techniques ont, en effet, l'avantage d'être associées à un mode de défécation qui peut être en principe appliqué au muscle puisque ce sont toujours à peu près les mêmes substances qu'il convient d'éliminer.

Aussi, nous rejetterons la méthode de ULZER et SEIDEL basée sur la transformation de l'acide lactique en acide oxalique par le permanganate en milieu alcalin. Après filtration, l'acide oxalique est oxydé en milieu acide cette fois, par une solution titrée de permanganate. On en déduit la quantité d'acide lactique. C'est une macrométhode.

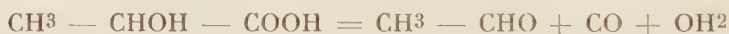
Nous rejetterons également la méthode de VOURNASOS qui semble n'avoir été appliquée qu'au suc gastrique, notamment par son auteur. Elle est basée sur ce fait que l'acide lactique

traité par l'iode en milieu alcalin donne de l'iodoforme selon l'équation :



L'iodoforme est séparé par distillation et on peut le peser ou le doser volumétriquement. Cette réaction semble intéressante en microanalyse surtout au point de vue qualitatif, car si on ajoute de la méthylamine au mélange, il se produit de la méthylcarbylamine dont l'odeur pénétrante permet de déceler immédiatement 5 mgr. % d'acide lactique dissous.

Une méthode classique de mesure de la lactacidémie est celle de CHELLE (36). Elle est basée sur la réaction codéinique de DENIGES (47). Sous l'influence de l'acide sulfurique concentré et à une température plus ou moins élevée, dit cet auteur, les acides alcools présentant une fonction alcool secondaire contiguë au carboxyl, perdent les éléments de l'acide formique en fournissant un corps à fonction aldéhydique. En particulier, l'acide lactique donne de l'aldéhyde acétique selon l'équation :



Dans certains cas et dans des conditions de dilution suffisante, le produit aldéhydique est assez stable pour être ultérieurement décelé par des réactifs appropriés, en général des phénols ou des alcaloïdes morpholiques. DENIGES utilise la codéine et procède dans les conditions suivantes : il met en jeu dans un tube, 0 cc. 2 d'une solution lactique qui ne devra pas renfermer plus de 2 % de cet acide de façon que, après addition d'acide sulfurique, le mélange ne brunisse pas quand on le chauffera et 2 cc. d'acide sulfurique pur (densité 1,84). Après mélange, il porte au bain-marie bouillant pendant deux minutes. Il sort le tube du bain-marie, laisse refroidir et ajoute I ou II gouttes d'une solution alcoolique au 1/20 de codéine. Il agite : une teinte jaune se développe pour des doses de l'ordre de 0 mgr. 01 d'acide lactique, et rouge pour des doses un peu plus élevées.

Pour la mesure de la lactacidémie, CHELLE préconise l'emploi de 6 tubes à essais contenant chacun 1 cc. de solution éta-

lon d'acide lactique à 0 gr. 01, 0 gr. 02, 0 gr. 04, 0 gr. 06, 0 gr. 08, 0 gr. 10 par litre, ce qui représente un échelonnement de 0 mgr. 01 à 0 mgr. 10 d'acide lactique mis en jeu dans ces tubes.

Le sang est déféqué par l'acide métaphosphorique de telle sorte que le filtrat corresponde volumétriquement au sang étendu au 1/10.

Dans une septième tube, on place 1 cc. de ce filtrat et dans un huitième tube 0 cc. 5 de filtrat plus 0 cc. 5 d'eau distillée donnant ainsi une dilution de sang au 1/20. On ajoute partout 5 cc. d'acide sulfurique; on porte au bain-marie comme il vient d'être dit, au sortir duquel on ajoute dans chaque tube cinq gouttes de solution de codéine. On agite. Au bout de 7 à 8 minutes, on compare les teintes obtenues dans les tubes 7 et 8 avec celles des tubes étalon. Si la teinte de l'un ou des deux tubes analyse est plus foncée que celle du tube étalon à 0 mgr. 10, on peut diluer le contenu des tubes analyse au 1/2, au 1/3 ou au 1/4 avec de l'acide sulfurique et comparer à nouveau en tenant compte de cette dilution.

Mais voici qu'apparaît le défaut de la méthode : Si le sang renferme plus de 1 gr. 50 de glucose par litre, on constate en regardant dans l'axe, que le contenu du tube 7 présente un léger brunissement provenant de l'action de l'acide sulfurique à chaud sur le glucose. Le tube 8 qui est encore très clair, permet donc en principe un dosage en présence d'une dose supérieure de glucose, mettons jusqu'à 3 gr. Mais dans ce dernier cas, on ne peut apprécier avec lui qu'une teneur de 0 gr. 20 d'acide lactique par litre (cas de l'égalité de sa teinte avec le premier tube de l'échelle).

En somme, on est gêné par le glucose et plus la dose de glucose croît dans le milieu plus la méthode perd en sensibilité. Pour nous qui devons opérer sur le muscle, le même inconvénient se présente. Encore, si nous ne devons opérer que sur le muscle de l'animal normal, les valeurs relatives entre glucides et acide lactique cadrent assez bien avec les conditions exigées par la méthode de CHELLE. Mais qui sait si au cours de nos expériences, nous ne rencontrerons pas parfois dans le muscle

une dose élevée de glucides en présence d'une dose très faible d'acide lactique? Cette conjecture est suffisante pour éliminer cette méthode de notre choix.

MEYERHOF conseille d'employer la technique de CLAUSEN (38) pour doser l'acide lactique dans un extrait de muscle. Celui-ci doit être préalablement débarrassé de ses protides par une défécation mercureille (SCHENK) et de ses glucides par une défécation à la chaux cuivrique (SALKOWSKI). Quelle est donc cette technique? De telles défécations sont-elles justifiables? La méthode de CLAUSEN est basée sur un principe déjà appliqué antérieurement par FURTH et CHARNAS (88). C'est l'oxydation ménagée de l'acide lactique par le permanganate de potasse et la distillation de l'acétaldéhyde formé dans une solution de bisulfite de soude.

La méthode originelle de FURTH et CHARNAS déterminait la quantité de bisulfite combiné par titration de l'excès. Elle ne mgr. d'acide lactique. CLAUSEN a modifié ce point. Il dissocie la combinaison aldéhydobisulfitique et titre le bisulfite combiné, ce qui permet de doser, d'après lui, jusqu'à 0 mgr. 2 d'acide lactique.

Nous allons étudier successivement toutes ces réactions afin de déterminer leur valeur au point de vue analytique.

L'oxydation de l'acide lactique en acétaldéhyde selon l'équation :



ne peut se produire quantitativement que dans des conditions de température et de dilution déterminées. Le permanganate doit affluer très lentement dans la liqueur lactique. La réaction est activée selon FRIEDEMANN, COTONIO et SCHAFFER (80) par le sulfate de manganèse.

La production d'acétaldéhyde doit cependant être conduite suffisamment lentement pour permettre sa combinaison intégrale avec le bisulfite. A ce point de vue, la modification de CLAUSEN est doublement intéressante. Elle permet de recevoir l'acétaldéhyde dans un grand excès de bisulfite ce qui accélère la combinaison. (Ce fait contrôlé par ailleurs par JAULMES et

ESPEZEL est en accord avec la théorie sur la vitesse des réactions).

De plus, on peut sans risque de perdre trop de SO_2 , faire circuler dans l'appareil distillatoire, un courant d'air destiné à assurer l'entraînement complet de tout l'acétaldéhyde formé.

Quand la réaction est terminée, l'excès de bisulfite est oxydé par l'iode en présence d'empois d'amidon. La combinaison aldéhydobisulfitique est alors partiellement dissociée par addition de bicarbonate de soude, et le bisulfite libéré est oxydé par l'iode tandis que la dissociation se poursuit jusqu'à devenir totale au fur et à mesure que de nouvelles portions de bisulfite libéré sont oxydées.

Il est un point que CLAUSEN n'a pas précisé, c'est l'influence du pH sur la vitesse de formation et sur la dissociation de la combinaison aldéhydobisulfitique.

JAULMES et ESPEZEL (107), étudiant le dosage de l'acétaldéhyde dans les vins et spiritueux, ont montré que la combinaison de l'acétaldéhyde avec le bisulfite s'effectue très lentement en milieu très acide, au contraire elle a lieu avec beaucoup de rapidité au pH 7, c'est-à-dire en milieu sensiblement neutre. La courbe ci-dessous établie par ces auteurs rend, d'ailleurs compte du pourcentage de combinaison après une minute de contact lorsque le pH varie :

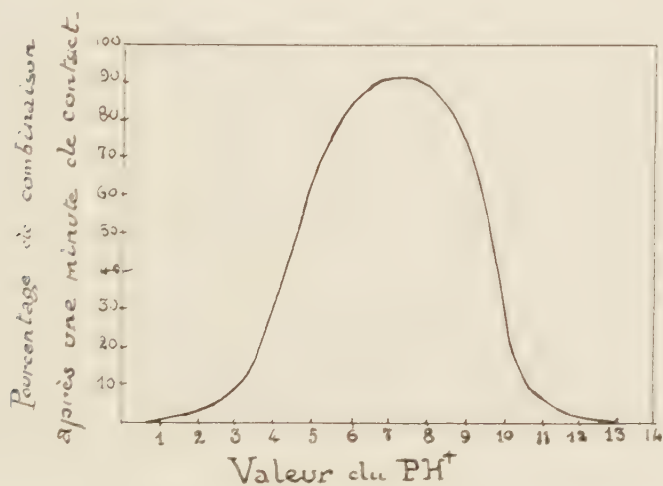
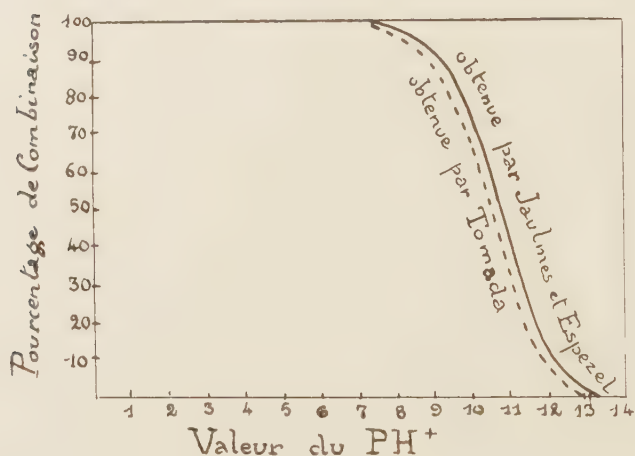


FIG. 6. — Pourcentage de combinaison aldehyde-bisulfite, suivant les valeurs du pH.

Ils ont ensuite déterminé la courbe de dissociation de l'acide aldéhydysulfureux en fonction du pH, travail fait antérieurement par TOMODA (265) :



Limite de combinaison en fonction du PH^+

FIG. 7. — Courbe de dissociation de la combinaison aldéhyde-bisulfite.

On voit que pour oxyder l'excès de bisulfite, il faut se placer à un pH nettement inférieur à 7, ce que fait CLAUSEN, pour ne pas risquer de détruire une partie même minime de la combinaison. Au contraire, pour titrer la combinaison, il faut se placer à un pH supérieur à 7 pour lequel le sulfite est progressivement libéré au fur et à mesure que s'effectue l'oxydation de la portion dissociée. L'emploi d'un grand excès de bicarbonate préconisé par CLAUSEN a pour effet de ramener le pH à 8. Mais JAULMES et ESPEZEL estiment qu'il y a intérêt à se placer à un pH aussi élevé que possible pour que la fin de la réaction soit très nette. Ils sont cependant limités dans cette voie parce que l'iode réagit sur l'aldéhyde en milieu alcalin

pour donner de l'iodoforme. Après avoir constaté que cette formation n'est pas appréciable après 20 minutes de contact, lorsque le pH est inférieur à 11, ils ont finalement adopté le borax ($\text{pH} = 9,5$) au lieu du bicarbonate pour obtenir la dissociation progressive de la combinaison.

Nous avons donc été amenés à nous demander s'il n'y avait pas lieu, pour doser l'acide lactique, de modifier la technique de CLAUSEN conformément aux observations de JAULMES et ESPEZEL.

CLAUSEN reçoit le courant aldéhydique dans une solution de bisulfite de soude N/100. Nous avons mesuré le pH d'une telle solution : il est de 4,3. La courbe de la fig. 6, fortement ascendante à ces abscisses, ne permet pas de déterminer avec une précision rigoureuse, le pourcentage de combinaison obtenu en une minute. On peut l'estimer cependant à environ 45 %. Or, dans la méthode de CLAUSEN, la production d'aldéhyde est réglée de telle façon que l'opération dure trois-quarts d'heure à une heure. Il y a donc tout lieu de penser que la combinaison est totale. Nous avons cependant tenu à le vérifier personnellement. Cherchant à retrouver par le dosage un milligramme d'acide lactique introduit dans l'appareil de CLAUSEN, nous avons dans quelques-unes de nos expériences, ajouté à la solution de bisulfite, une solution à base de phosphate monopotassique et de phosphate disodique. Cette solution tampon préconisée par JAULMES et ESPEZEL pour le dosage de l'acétaldéhyde dans les vins, a pour effet de ramener le pH à 7.

Les résultats obtenus dans ces derniers cas ne diffèrent pas des autres. Nous retrouvons en général 95,5 à 98 % de l'acide lactique introduit, ce qui donne en même temps une idée de la précision de la méthode en solution pure.

L'emploi de la solution-tampon n'est donc pas indispensable. De même, lors de l'oxydation par l'iode de la combinaison aldéhydobisulfitique, nous n'avons pas jugé utile de substituer le borax au bicarbonate, la fin de la réaction étant suffisamment nette à notre avis avec ce dernier.

En définitive, si les observations de JAULMES et ESPEZEL ne conduisent pas obligatoirement à modifier la technique de

CLAUSEN, elles confirment la nécessité impérieuse de conduire la production d'acétaldéhyde aussi lentement que possible, ce que nous avons toujours fait.

La double défécation préalable, éliminant protides et glucides, est pleinement justifiable.

Dans le but d'appliquer sa méthode à des dosages biologiques, CLAUSEN a, en effet, constaté qu'un grand nombre de substances organiques produisent dans les conditions du dosage, une combinaison bisulfitique. Il a même mesuré l'importance de cette combinaison en l'exprimant en centimètres cubes d'iode N par molécule gramme de substance essayée. Comme on pouvait le prévoir, les hydroxyacides donnent un taux assez élevé ainsi que le glucose. L'aldéhyde glycérique, l'acide gluconique, l'acide pyruvique donnent des taux plus faibles; l'acide citrique donne de l'acétone qui se combine au bisulfite. L'acide β -hydroxybutyrique, la créatinine et l'acide urique interviennent assez peu, les aminoacides très peu.

Des méthodes spéciales pour séparer l'acide lactique de telles substances ont alors été proposées. Si elles étaient efficaces, elles seraient préférables à une défécation protidique et glucidique, mais il n'en est rien malheureusement.

Ces méthodes sont, en effet, toutes basées sur les différences de solubilité respectives de l'acide lactique et des autres composés dans des solvants appropriés.

OHLSSON (199) a proposé l'acétate d'éthyle. Les alcools amylique ou butylique peuvent être aussi employés, mais CLAUSEN préfère l'éther dont le point d'ébullition est moins élevé. Il opère dans un appareil à extraction continue selon une technique présentée par PINNOW (213). La sélection de l'acide lactique est loin d'être parfaite puisque, alors qu'on extrait 99 % d'acide lactique en une demi-heure, on extrait dans le même temps, 5 % d'acide citrique, 60 % d'acide glycollique et 100 % d'acide β -hydroxybutyrique.

L'appareil réclame de plus une prise d'essai au volume réduit (2 cc.), de sorte qu'une telle extraction, possible avec l'urine, est malaisée sur un extrait de muscle ou sur le sang. Il faudrait évaporer, encore ne faudrait-il le faire que sous pres-

sion réduite. A 100°, on risquerait, en effet, en milieu acide, une perte d'acide lactique et, si on passait en milieu alcalin, le glucose donnerait des composés qui, extraits par l'éther, agiraient sur le bisulfite. Enfin, en milieu trop acide, le glucose produit de l'acide formique. Tous ces faits ont conduit CLAUSEN à abandonner l'extraction à l'éther pour la mesure de la lactacidémie et à la remplacer par des défécations analogues à celles que MEYERHOF emploie pour le muscle.

Il est évident que la méthode n'est pas spécifique puisqu'on dose en acide lactique tous les α -hydroxyacides qui passent dans les filtrats dans ces conditions. Nous sommes cependant obligés de l'adopter comme l'a fait MEYERHOF, comme l'ont fait ensuite CAHN et HOUGET, car actuellement, il n'y a en biologie, aucune méthode spécifique du dosage de l'acide lactique. La précipitation à l'état de lactate de zinc que nous citons comme méthode de contrôle au début de cet exposé, est elle-même sujette à caution. D'après CLAUSEN, le précipité contient souvent des impuretés, qui empêchent sa cristallisation.

III. — Etude critique des méthodes de dosage des composés phosphoriques et du phosphore total acidosoluble

Nous nous sommes limités au dosage des composés phosphoriques les plus importants, à savoir : les orthophosphates, l'acide créatinéphosphorique, l'acide adénylpyrophosphorique, les esters facilement hydrolysables et nous y avons joint le phosphore total acidosoluble.

Tous ces composés sont, en effet, solubles dans l'acide trichloracétique, de sorte qu'il est facile de les extraire du muscle au moyen d'une solution de cet acide. Les orthophosphates peuvent être précipités facilement de la liqueur d'extraction par un réactif citromagnésien après neutralisation. Mais il n'est pas aussi facile de précipiter isolément chacun des composés phosphoriques labiles, précisément à cause de leur labi-

lité. Ces composés sont, en effet, plus ou moins hydrolysables à la température ordinaire en milieu acide, d'où la nécessité, pour avoir un dosage d'orthophosphates correct, d'opérer l'extraction rapidement et à 0° ou même au-dessous, sinon l'acide phosphorique libéré par hydrolyse s'ajoute à celui des orthophosphates. La seule méthode pratique et rapide pour apprécier le taux des composés labiles a été proposée par MEYERHOF et LOHMANN. Elle consiste à doser l'acide phosphorique libéré par l'hydrolyse respective de ces corps.

A. CONDITIONS D'HYDROLYSE DES COMPOSÉS PHOSPHORIQUES LABILES.

a) *Acide créatinephosphorique.* — L'acide créatinephosphorique a, d'après CANNAN et SHORE (31) une constante K de vitesse d'hydrolyse égale à $7,5 \times 10^{-3}$ à 28°, en milieu chlorhydrique normal. Pour fixer les idées, calculons le pourcentage d'acide créatinephosphorique hydrolysé dans ces conditions en 10 minutes par exemple. La formule

$$K = \frac{1}{t} \log. \frac{a}{a-x}$$

dont nous avons parlé au premier chapitre au sujet de l'hydrolyse des esters hexosephosphoriques nous donne

$$\log. \frac{100}{100-x} = 7,5 \times 10^{-3} \times 600 = 4,5$$

$$\text{d'où} \quad \frac{100}{100-x} = 31660$$

$$\text{d'où} \quad x = 99,9.$$

On voit que pratiquement, tout l'acide créatinephosphorique est hydrolysé en 10 minutes. K varie avec la température. A 100° l'hydrolyse est tellement rapide qu'elle n'est pas me-

surable. Enfin K ne croît pas proportionnellement à l'acidité du milieu, mais à la température ordinaire elle atteint quinze fois sa valeur en présence d'acide sulfomolybdique (MEYERHOF [173]), de sorte que le mélange d'un réactif sulfomolybdique à une portion aliquote de la liqueur d'extraction trichloracétique y assure en dix minutes une hydrolyse complète de l'acide créatinephosphorique. Dans ces conditions, les autres composés n'étant pratiquement pas hydrolysés, on dose le phosphore correspondant à la somme orthophosphates + acide créatinephosphorique.

b) *Acide adénylpyrophosphorique*. — Nous avons reproduit au chapitre précédent la courbe d'hydrolyse de l'acide adénylpyrophosphorique en milieu chlorhydrique normal à 100° d'après les déterminations de LOHMANN. Cette courbe a un aspect très caractéristique. Elle monte presque verticalement pendant les 7 premières minutes, fait à l'abscisse 7 un coude brusque et devient presque horizontale. On peut donc dire que pratiquement l'acide adénylpyrophosphorique est hydrolysé en 7 minutes.

Il faut craindre, en effet, si on dépasse cette durée, l'hydrolyse des esters facilement hydrolysables, celle de l'ester de HARDEN et YOUNG en particulier, comme on peu s'en rendre compte sur les courbes de la fig. 4.

LOHMANN corrige même les chiffres fournis par l'hydrolyse de 7 minutes en se basant sur le fait que l'hydrolyse de l'ester de HARDEN et YOUNG fournit deux fois plus d'acide phosphorique en trente minutes qu'en sept minutes. A l'exemple de CAHN, HOUGET et JACQUOT, nous n'avons pas cru devoir faire cette correction vu la faible quantité d'acide phosphorique libéré par une hydrolyse de 30 minutes. Au bout de 7 minutes, en milieu chlorhydrique normal à 100°, on peut donc en définitive, doser le phosphore provenant pratiquement de la somme orthophosphates + acide créatinephosphorique + acide adénylpyrophosphorique.

c) *Esters hexosephosphoriques*. — Nous avons vu que l'examen des courbes d'hydrolyse des esters hexosephosphoriques

permet de diviser ceux-ci en esters facilement et difficilement hydrolysables. L'abscisse critique pour la séparation des premiers est l'abscisse de 3 heures qui donne une hydrolyse de 87 % de l'ester de HARDEN et YOUNG et de 75 % de l'ester de NEUBERG, contre 30 % pour l'ester de ROBISON et 25 % pour celui d'EMBDEN. En deçà ou au-delà de 3 heures, les différences entre les deux groupes sont moins nettes.

Par conséquent, au bout de 3 heures, en milieu chlorhydrique normal à 100°, en plus du phosphore dosable en 7 minutes, on dose le phosphore des esters, mais surtout le phosphore des esters facilement hydrolysables.

C'est pourquoi nous appellerons, par abréviation : phosphore des esters facilement hydrolysables, la différence entre le phosphore de l'acide phosphorique libéré en 3 heures et le phosphore de l'acide phosphorique libéré en 7 minutes. Il va sans dire que théoriquement cette appellation est impropre.

LOHMANN détermine ensuite les esters difficilement hydrolysables par différence entre le phosphore total acidosoluble et le phosphore de l'acide phosphorique hydrolysable en 3 heures. Nous n'avons pas adopté cette manière de voir, car dans un tissu ayant subi une extraction trichloracétique préalable, on ne trouve plus, d'après CAHN, HOUGET et JACQUOT, la totalité du phosphore lipidique. On peut donc penser que cette fraction de phosphore lipidique disparue, a été solubilisée dans l'acide trichloracétique et qu'elle vient s'ajouter au phosphore des esters difficilement hydrolysables.

d) *Phosphore total acidosoluble*. — Ce phosphore peut être dosé dans les cendres d'une partie aliquote de la liqueur d'extraction. Mais on se heurte, en employant cette méthode, à des difficultés d'ordre technique : nécessité d'une portion aliquote importante, risque de projection inhérent à toute évaporation, risque de perte à la calcination. Il est préférable de pratiquer une minéralisation sur une portion aliquote très faible de liqueur trichloracétique dans un matras dit de microkjeldahl. On peut faire une minéralisation sulfonitrique. Nous avons toutefois préféré, comme plus rapide, une minéralisation par l'emploi conjugué de l'acide sulfurique et du perhydrol.

B. — DOSAGE DU PHOSPHORE

Les méthodes de dosage du phosphore à l'état orthophosphorique sont nombreuses. Une des plus classiques consiste à le précipiter par la liqueur citromagnésienne en phosphate d'ammonium et de magnésium. C'est de cette façon que nous avons isolé les orthophosphates du muscle. En macroanalyse, ce précipité est porté au rouge vif pour le transformer en pyrophosphate de magnésium qu'on peut peser, ou dissoudre dans l'acide azotique et titrer volumétriquement par l'azotate d'uranyle. Comme nous mettons en jeu généralement 0 mgr. 4 à 0 mgr. 8 de phosphore, cette méthode est inutilisable.

La formation directe de phosphate d'uranyle est également inapplicable pour doser le phosphore des composés labiles.

La précipitation de l'acide phosphorique à l'état de phosphomolybdate d'ammonium est déjà beaucoup plus compatible avec les exigences de la microanalyse. On sait, en effet, que le poids moléculaire très élevé, 1904, de ce précipité, correspond à 71 parties seulement de P_2O_5 . Malgré tout, la masse dont on dispose est encore trop faible pour permettre un dosage pondéral. Un dosage volumétrique correct à partir du phosphomolybdate n'est possible qu'en mettant en jeu au moins 4 mgr. de phosphore.

Nous sommes arrivés de cette façon, à doser le phosphore total acidosoluble dans une portion aliquote assez importante de la liqueur d'extraction trichloracétique, après minéralisation sulfonitrique. La technique suivie a été celle de NEUMANN-GREGERSEN qui consiste à dissoudre le précipité de phosphomolybdate dans une quantité connue en excès de soude N/2, à chasser l'ammoniaque par ébullition puis, après avoir neutralisé par un excès connu d'acide sulfurique N/2, l'acide carbonique est chassé par ébullition de 5 minutes et le titrage est terminé avec la soude N/2.

Outre l'obligation d'utiliser une portion aliquote importante de la liqueur d'extraction, ce procédé nécessite de longues manipulations. La précipitation du phosphomolybdate demande, en effet, des précautions minutieuses. Le réactif nitromo-

lybdique ne doit pas être mélangé tout de suite avec la liqueur. Il est conseillé de le faire couler avec précaution sur les parois du verre et de n'agiter le mélange qu'au bout de 2 heures sans frotter les parois du vase. Le mélange est alors abandonné 5 heures à l'étuve à 50° et on filtre sur entonnoir de JOULIE. Puis le précipité est lavé par décantation et filtration avec de l'eau contenant 1/20 de son volume de réactif molybdique. Le lavage (qui doit être poursuivi jusqu'à réaction négative des sulfates) ne peut être fait au début avec de l'eau pure, car dans ces conditions, le précipité passe à travers le filtre.

Tous ces inconvénients nous ont fait abandonner cette technique pour rechercher un procédé présentant les mêmes garanties d'exactitude mais plus expéditif et surtout ne nécessitant pas une prise d'essai trop considérable.

Nous nous sommes alors tournés vers les méthodes colorimétriques.

Nous avons vu, au sujet du dosage des glucides par la technique de FONTES et THIVOLLE, qu'en présence de phosphore d'une part et d'un réducteur d'autre part, l'anhydride molybdique peut se réduire partiellement en anhydride molybdeux et qu'il y a formation d'un conjugué phospho-molybdoso-molybdique dont la teinte est bleu foncé. Se basant sur ces faits, DENIGES a proposé l'emploi du chlorure d'étain comme réducteur, pour doser colorimétriquement le phosphore sanguin au moyen d'un réactif sulfomolybdique.

L'auteur fait remarquer que sa méthode conduit à des résultats très inexacts si on opère directement sur le filtrat sanguin de désalbumination trichloracétique. Il faut opérer après avoir détruit les matières organiques. Or, comme l'acide trichloracétique est présent dans la liqueur d'hydrolyse des composés phosphoriques labiles, nous n'avons pas retenu l'emploi du chlorure d'étain.

BELL et DOISY (17) en 1920, ont constaté l'action réductrice de l'hydroxylamine et de beaucoup de phénols sur l'acide molybdique en présence d'acide phosphorique et ils ont institué une méthode de dosage de l'ion phosphorique en adoptant l'hydroquinone comme agent réducteur.

Sans chercher à identifier s'il y avait formation du complexe ceruléomolybdique, ils se sont bornés à constater que l'hydroquinone donne au réactif molybdique une coloration verdâtre dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de phosphates présents. Puis ils ont constaté que cette coloration s'intensifiait en bleuissant en milieu alcalin et que toute coloration verdâtre disparaissait par addition de sulfite.

Ils opèrent donc en présence de carbonate et de sulfite de soude et, dans ces conditions, il est possible d'apprécier par colorimétrie, 0,005 mgr. de phosphore dans un volume de 100 cc.

La méthode a été appliquée par ces auteurs à la détermination du phosphore inorganique et du phosphore total acidosoluble dans le sang, le plasma et le sérum. Elle est compatible avec une extraction trichloracétique.

BRIGGS (27) étudiant cette méthode deux ans plus tard, a reproché à BELL et DOISY, la fugacité de la coloration bleue obtenue. Il a modifié leur technique en précisant que lorsqu'une petite quantité de sulfite de soude est ajoutée à une solution phosphomolybdique, l'addition subséquente d'hydroquinone produit la formation d'une coloration bleu intense à la place de la teinte verte, obtenue primitivement par BELL et DOISY. Cette coloration bleue ne provient pas de la réduction de l'acide molybdique par SO_2 , puisque le mélange de solutions de sulfite de sodium, d'hydroquinone et d'acide molybdique ne donne aucune coloration. La modification de BRIGGS réside donc dans l'ordre de distribution des réactifs, qui est le suivant : prise d'essai, réactif molybdique, solution de sulfite, solution d'hydroquinone et eau. La coloration qu'il obtient est moins fugace que dans la méthode de BELL et DOISY. Elle se développe en 30 minutes, ce qui a l'avantage de permettre plusieurs dosages avec une seule fiole étalon.

Deux ans après, BRIGGS (28) publia une nouvelle modification de la méthode et changea à nouveau l'ordre des réactifs. Il mélange prise d'essai, molybdate et hydroquinone et met le sulfite en dernier lieu après l'apparition de la teinte verte due à l'hydroquinone. Constatant que le développement de la colo-

ration est retardé par une grande proportion d'acide, l'auteur réduit la proportion d'acide à mettre en jeu. La méthode est applicable au dosage du phosphore inorganique et du phosphore organique hydrolysable du sang, toujours par extraction trichloracétique.

Elle est encore applicable au dosage du phosphore total acidosoluble, après minéralisation sulfonitrique, à condition toutefois de chasser tout l'acide nitrique et de conserver le maximum d'acide sulfurique. C'est pourquoi, l'auteur a proposé une technique de minéralisation par l'acide sulfurique et l'eau oxygénée à 30 % qui est plus pratique.

FISKE et SUBBAROW (72) enfin, en 1925, critiquant la fugacité de la coloration obtenue par BELL et DOISY et l'inconstance des modifications de technique proposées par BRIGGS, ont institué une nouvelle méthode de dosage colorimétrique des phosphates.

Le principe est toujours la réduction colorée de l'acide molybdique proportionnelle à la quantité de phosphates présents. Mais l'agent réducteur n'est plus l'hydroquinone, c'est l'acide amino-naphtol-sulfonique 1, 2, 4, en solution bisulfite-sulfite. Ce réactif ajouté au mélange de la solution phosphorique à doser et d'un réactif sulfomolybdique, développe en 10 minutes à 37°, une coloration d'un bleu très franc, suffisamment stable pour permettre des dosages multiples avec un seul étalon.

De plus, une petite quantité d'acide nitrique présente dans la liqueur ne gêne pas la coloration. On peut donc employer si on veut, la minéralisation sulfonitrique pour doser le phosphore total acidosoluble dans ces conditions. Enclins à choisir cette méthode, nous avons tenu, auparavant, à apprécier personnellement sa sensibilité. C'est ainsi qu'il nous a été donné de constater que l'addition de 0 mgr. 008 de phosphore orthophosphorique au mélange des réactifs sulfomolybdique et aminonaphtolsulfonique étendu à 100 cc. avec de l'eau, produit déjà une coloration visible en quelques secondes. La mesure de l'intensité de cette coloration devient possible avec 0 mgr. 16 de phosphore en utilisant le colorimètre de DUBOSCQ sous 8 à

10 cm. Pratiquement, la dose étalon à mettre en jeu conseillée par les auteurs, est de 0 mgr. 4 de phosphore.

L'acide trichloracétique n'a pas d'action sensible sur la coloration, tout au moins aux doses où nous l'employons. Cependant FISKE et SUBBAROW appliquant leur méthode au dosage du phosphore inorganique du sang jugent utile de contrebalancer son action très légèrement interférente, en utilisant un réactif sulfomolybdique plus riche en acide sulfurique dans la fiole-étalon que dans la fiole-témoin. Pour le muscle, vu la faible quantité d'acide trichloracétique en présence, c'est inutile.

Nous avons donc là une méthode précise, sensible et très générale nous permettant de doser tous les composés phosphoriques qui nous intéressent. Nous l'adoptons sans restriction, si ce n'est que pour le phosphore acidosoluble total nous préférons employer la minéralisation par l'acide sulfurique + eau oxygénée que nous trouvons plus pratique que la minéralisation sulfonitrique.

Les auteurs insistent enfin sur la nécessité de vérifier la pureté de l'acide trichloracétique. « Un échantillon que nous avons isolé, disent-ils, contenait une impureté inconnue retardant le développement de la coloration à un degré assez prononcé. Nous utilisons le produit Merck qui ne contient pas cette impureté mais qui contient des traces de phosphate. » Suit une technique permettant de doser ces traces de phosphate et de faire la correction nécessaire.

Nous avons toujours pour cette raison essayé nos échantillons d'acide trichloracétique provenant des maisons DARRASSE ou RHONE-POULENC. A cet effet, nous avons institué un procédé calqué sur celui de FISKE et SUBBAROW et décrit au chapitre suivant. Nous nous devons de signaler que jamais nous n'avons décelé dans nos acides, la présence de phosphates ou d'une impureté agissant sur la coloration.

Les techniques à employer dans ce travail étant ainsi définitivement arrêtées, nous allons les décrire en détail, les appliquant tout d'abord au muscle des principaux animaux de laboratoire recevant une alimentation normale.

CHAPITRE III

APPLICATION DES TECHNIQUES DE DOSAGE PRECEDEMMENT CHOISIES AU MUSCLE DE QUELQUES ANIMAUX DE LABORATOIRE.

D'après ce que nous avons exposé au chapitre premier, le but essentiel de ce travail doit consister à apprécier des différences entre la valeur normale de repos des substances glucidiques du muscle et la valeur qu'elles pourront prendre sous l'influence de certaines carences alimentaires.

Nous allons, dans ce chapitre III, entrer dans le vif du sujet en établissant pour commencer, la valeur de repos des substances glucidiques de muscles déterminés d'animaux normaux, appartenant aux diverses espèces qui servent habituellement à l'étude des carences.

Les muscles étudiés étant toujours les mêmes pour une espèce donnée, nous apprécierons les variations des résultats d'un animal à l'autre. Si les différences observées ne sont pas trop sensibles, il deviendra alors logique de calculer une moyenne qui sera en somme représentative de l'espèce et du muscle étudiés.

Nous entendons par animaux normaux, des animaux adultes ne présentant aucun signe clinique de maladie, n'étant pas en gestation et recevant l'alimentation variée naturelle convenant à leur espèce. Nous avons étudié successivement les pigeons voyageurs, les rats blancs, les cobayes et, accessoirement, les pigeons-paons et les lapins (135), (53).

Nous diviserons ce chapitre en trois parties : la première

traitant de la préparation du muscle, la seconde des défécations et dosages proprement dits, la troisième présente les résultats et leur discussion.

I. — PREPARATION DU MUSCLE

Cette préparation consiste à traiter le muscle de façon à amener sa composition à la valeur de repos et à maintenir cette valeur jusqu'aux opérations de défécation. Nous distinguerons trois étapes :

- 1) Préparation *in situ* qui consiste à faire vivre et à tuer l'animal dans des conditions déterminées.
- 2) Prélèvement.
- 3) Pesée et fixation.

1. Préparation des animaux et mise à mort

Afin d'obtenir pratiquement un bon repos musculaire, tous les animaux seront placés dans des cages obscures et étroites pendant une douzaine d'heures, au bout desquelles ils seront sacrifiés. La mise à mort devra être aussi rapide que possible pour limiter les contractions de l'agonie. Aussi nous avons trouvé commode de pratiquer l'ablation de l'encéphale sur les petits animaux (rats, pigeons), et pour les animaux plus gros (cobayes, lapins) nous avons eu recours à un violent traumatisme de l'encéphale. Il ne saurait être question d'obtenir la mort par asphyxie, qui provoquerait de fâcheuses contractions musculaires, compliquées peut-être d'anaérobiose et d'intoxication cellulaire, ni d'opérer un prélèvement sous anesthésie, les anesthésiques pouvant modifier le métabolisme des substances qui nous occupent et fausser les résultats. Il va sans dire qu'après l'ablation ou le traumatisme de l'encéphale, on observe quelques contractions musculaires inévitables, surtout

chez le pigeon, mais qui restent pour une même espèce, très comparables d'un animal à l'autre.

Les actions fermentaires commençant à se manifester immédiatement après la mort, il est indispensable de les entraîner en prélevant, pesant et fixant les échantillons avec le maximum de rapidité.

2. Choix et prélèvement des muscles

Comme il importe pour une espèce animale donnée de travailler toujours sur les mêmes muscles, il y a lieu d'arrêter son choix d'une façon définitive. Pour le pigeon, nous nous sommes adressés aux muscles pectoraux. Sitôt la tête coupée, l'animal est ouvert sur sa face ventrale et les deux grosses masses musculaires pectorales (particulièrement développées chez les voyageurs) apparaissent de chaque côté du bréchet, facilement détachables.

Chez le lapin, le rat et le cobaye, nous avons choisi les masses musculaires des pattes postérieures, de façon à ne pas être obligés de dépouiller entièrement l'animal, toujours dans le but d'opérer avec célérité. Ainsi, les deux pattes postérieures d'un lapin sont rapidement dénudées et on détache les lambeaux de muscles par sections longitudinales. Pour le rat, on opère d'une façon analogue, mais il est nécessaire de disposer de 5 à 6 animaux, suivant leur grosseur, pour avoir des prélèvements suffisants.

Nous insistons sur ce point qu'il vaut mieux avoir recours à un plus grand nombre d'animaux si le prélèvement est jugé insuffisant que de s'adresser à d'autres muscles, les muscles lombaires, par exemple, qui risquent d'avoir une composition différente.

Même façon d'opérer et même remarque pour le cobaye : deux animaux de grosseur moyenne sont nécessaires.

3. Pesée, hydrolyse et fixation

Les prélèvements musculaires rapidement et soigneusement débarrassés de leurs aponévroses sont aussitôt divisés en prises d'échantillons destinées aux dosages des trois catégories de substances :

a) Composés réducteurs glucidiques à hydrolyser.

b) Acide lactique à fixer.

c) Composés phosphoriques à extraire et fixer.

On voit donc que dans le cas où plusieurs animaux sont nécessaires, il ne faut pas les tuer successivement, au fur et à mesure des besoins en échantillons. Comme il s'agit d'établir une composition moyenne du muscle, il faut au contraire les tuer simultanément (en se faisant aider pour aller le plus vite possible), mélanger leurs muscles après avoir enlevé les aponévroses et répartir en prises d'essai.

a) HYDROLYSE DES COMPOSÉS RÉDUCTEURS GLUCIDIQUES.

5 à 10 gr. de muscle sont pesés dans un ballon dit « à saponification » de 100 cc. environ, contenant 30 cc. d'acide sulfurique à 1 % puis le ballon muni de son réfrigérant ascendant, est placé dans un bain-marie bouillant à 100°, à niveau constant, pendant trois heures.

b) FIXATION DE L'ACIDE LACTIQUE.

15 gr. de muscle sont découpés rapidement en petits fragments avec des ciseaux puis sont pesés dans un bécher en pyrex de 100 cc. environ contenant 30 cc. d'acide sulfurique à 2 %. Le bécher est aussitôt introduit au sein d'un mélange à parties égales de glace pilée et de sel marin contenu dans un récipient d'au moins 25 à 30 cm. de diamètre et dont le fond est percé de trous. Le tout est placé dans le réservoir à glace d'une glacière au voisinage d'un pain de glace, pendant 4 à 5 heures. On vérifie dans ces conditions que le contenu du bé-

cher se congèle rapidement et que sa température devient vite inférieure ou égale à -5° .

c) EXTRACTION ET FIXATION DES COMPOSÉS PHOSPHORIQUES.

La fixation se produit en opérant rapidement l'extraction à basse température. C'est pourquoi il est nécessaire de refroidir auparavant tout le matériel d'analyse et la liqueur d'extraction. A cet effet, on aura au préalable fait séjourner à la glacière : un becher de pyrex de 100 cc., un petit mortier de 12 cm. de diamètre environ et deux solutions aqueuses d'acide trichloracétique pur, l'une à 10 %, l'autre à 4 %.

Pour les gros animaux (pigeons, lapins), 25 gr. de muscle sont pesés rapidement dans le bécher, transvasés dans le mortier et broyés avec 10 à 20 gr. de solution trichloracétique à 10 % qu'on aura partiellement congelée au dernier moment de la façon suivante : on détend un peu d'anhydride carbonique liquide dans une feuille de coton cardé, celle-ci s'imprègne dans toute son épaisseur de neige carbonique, on la place au fond d'une boîte ronde en carton ou en bois; une petite fiole contenant la solution trichloracétique à 10 % est posée dessus jusqu'à commencement de congélation.

Ce procédé a le double avantage d'abaisser la température et de faciliter le broyage grâce aux cristaux formés qui déchirent facilement les fibres musculaires. Le liquide surnageant est décanté dans un entonnoir de Buchner de 8 cm. de diamètre placé sur une fiole à vide de 250 cc., reposant elle-même dans un récipient contenant de la glace pilée.

L'extraction est renouvelée une seconde fois de la même façon puis continuée avec de l'acide trichloracétique à 4 % jusqu'à ce qu'on ait recueilli environ 120 cc. de filtrat. Celui-ci est transvasé dans une fiole jaugée et ajusté à 150 cc. avec de l'eau distillée.

Pour les animaux plus petits (cobayes et rats), nous avons été amenés à réduire la prise d'échantillon. On peut employer 16 gr. de muscle pour le cobaye et 8 gr. seulement pour le rat

blanc, en opérant d'une façon analogue mais en réduisant proportionnellement les doses d'acide trichloracétique et le volume des fioles utilisées. Pour les cobayes, nous prenons une fiole à vide de 200 cc., qui reçoit par le même entonnoir que précédemment un filtrat qui sera ajusté à 100 cc. Pour les rats blancs, nous avons fait fabriquer une fiole à vide en pyrex de 100 cc. sur laquelle s'adapte un entonnoir de Buchner de 5 cm. de diamètre et qui permet de recevoir un filtrat qui sera ajusté à 50 cc.

Les muscles de pigeon sont les plus faciles à broyer, ceux de rats sont particulièrement durs et nécessitent une trituration plus longue, durant laquelle il faut veiller au maintien de la température au-dessous de 0°. La liqueur d'extraction est jaunâtre avec le muscle de pigeon, incolore avec les muscles des autres animaux analysés.

Avant que le filtrat ajusté ne se réchauffe, il faut précipiter les orthophosphates. A cet effet, on en prélève 7 cc. qu'on place dans une fiole jaugée, neutralise par l'ammoniaque en présence de phénolphthaleïne et traite par 20 cc. d'une liqueur citromagnésienne obtenue de la façon suivante : dissoudre 40 gr. d'acide citrique dans 500 cc. d'eau et introduire dans la solution chaude 20 gr. de magnésie légère ; après refroidissement, ajouter 400 cc. d'ammoniaque de densité 0.880 ; compléter à 1.500 cc. avec de l'eau, filtrer et conserver dans un flacon bouché à l'émeri sans se soucier du précipité ultérieur.

II. — DEFECATIONS ET DOSAGES

Suivant le même ordre que dans le paragraphe précédent, nos déterminations portent successivement sur les composés réducteurs glucidiques, l'acide lactique et les composés phosphoriques.

A. Composés réducteurs glucidiques totaux

1) DÉFÉCATION (FONTES et THIVOLLE).

Le ballon dans lequel s'est effectué l'hydrolyse de trois heures est sorti de son bain-marie, et son contenu est transvasé après l'avoir agité dans une fiole jaugée de 100 cc. On rince par jets de pissette et on transvase dans la fiole les derniers fragments de muscle adhérant encore aux parois du ballon. Puis on défèque par 18 cc. d'acide sulfurique N 4/3 et 18 cc. de tungstate de soude à 20 %. On ajuste à 100 cc. avec de l'eau distillée, on agite, on laisse reposer une douzaine d'heures et on filtre.

2) DOSAGE (FONTES et THIVOLLE).

Pour procéder au dosage du pouvoir réducteur du filtrat et l'estimer en glucose, les solutions et réactifs suivants sont nécessaires :

1) Solution saturée de carbonate de potassium.

2) Liqueur cuprotartrique alcaline en deux solutions.

Solution A :

Sulfate de cuivre cristallisé.....	17 gr. 50
Acide sulfurique pur	2 cc. 50
Eau distillée	q. s. p. 1.000 cc.

Solution B :

Carbonate de soude anhydre.....	80 gr.
Acide tartrique	15 gr.
Eau distillée	q. s. p. 1.000 cc.

Pour l'usage, mélanger un volume de A et un volume de B; porter le mélange à l'ébullition et l'y maintenir une minute (cette opération produit une sorte de sensibilisation du réactif. Il se produit souvent une légère réduction absolument négligeable).

3) Solution saturée de sulfate de magnésium.

4) Solution saturée de carbonate de sodium.

5) Réactif phosphomolybdique :

Molybdate d'ammoniaque 40 gr.

Lessive de soude ($d = 1,36$) 60 cc.

Ajouter environ 100 cc. d'eau et soumettre à l'ébullition jusqu'à disparition complète de l'ammoniaque. Refroidir, ajouter environ 200 cc. d'eau puis :

Acide phosphorique ($d = 1,38$) 200 cc.

Faire bouillir 15 minutes. Refroidir et compléter le volume à 1.000 cc. avec de l'eau distillée.

6) Solution de permanganate de potassium à 0 gr. 08 pour 1.000 qui sera faite et souvent renouvelée à l'aide d'une solution de permanganate de potassium N/10 beaucoup plus stable selon la dilution :

MnO_4K N/10. 6 cc. 30

Eau distillée q. s. p. 250 cc.

7) Solution étalon de glucose.

Dessécher à l'étuve jusqu'à poids constant, une petite quantité de glucose chimiquement pur, en peser 1 gr. très exactement qu'on introduit dans une fiole jaugée de 1.000 cc., ajuster avec de l'eau distillée. La solution obtenue se conserve parfaitement sous une couche de toluène. Un centimètre cube de solution correspond à un milligramme de glucose.

La *technique* utilisée sera la suivante :

Choisir deux tubes à centrifuger (une centrifugeuse à main est suffisante). Placer 5 cc. du filtrat à analyser dans l'un des tubes et neutraliser en présence de phénolphtaléine par la solution saturée de carbonate de potassium versée goutte à goutte à la pipette tandis qu'on agite le tube.

Dans l'autre tube on place 1 cc. de la solution de glucose au 1/1.000^e, 4 cc. d'eau distillée et pour opérer comparative-ment on ajoute une goutte de phénolphtaléine et une goutte de la solution de carbonate de potassium.

On distribue alors 1 cc. de liqueur euprotartrique dans cha-

que tube et on les porte au bain-marie bouillant pendant six minutes exactement. Au bout de ce temps, les tubes sont rapidement sortis du bain-marie et il est versé dans chacun d'eux cinq gouttes de la solution saturée de sulfate de magnésium et quatre gouttes de la solution saturée de carbonate de sodium. Cette opération doit être aussi rapide que possible et ne pas durer plus d'une demi-minute.

Pour cette raison, il est commode d'avoir à sa disposition des solutions de sulfate de magnésium et de carbonate de sodium dans des flacons compte-gouttes type Rémond. Les tubes sont replongés pendant une minute dans le bain-marie pour rendre le précipité plus compact, puis ils sont remplis d'eau bouillante et centrifugés. L'eau de lavage est décantée et on verse aussitôt dans chaque tube 5 cc. de réactif phosphomolybdique. Le précipité se dissout en même temps que se développe la coloration bleue intense du complexe céruléomolybdique. Pour activer la dissolution, il est pratique de gratter le fond du tube avec une pipette longuement effilée et dont l'extrémité est fermée à la lampe.

On attend quelques minutes pour permettre à la teinte d'atteindre son maximum d'intensité, puis on effectue le titrage au permanganate après avoir transvasé par rinçage le contenu de chaque tube respectivement dans deux vases appropriés, deux béchers de 100 cc. par exemple. Le rapport des volumes de permanganate versés pour obtenir une décoloration complète dans le vase-analyse d'une part et dans le vase-étalon d'autre part, exprime en milligrammes le poids de glucose contenu dans les 5 cc. du filtrat.

B. Acide lactique

1) DÉFÉCATION (SCHENK-SALKOWSKI).

L'échantillon musculaire destiné au dosage de l'acide lactique est, au sortir de la glacière au sein de la solution sulfurique à 1 %, complètement solidifiée. Le bécher qui le con-

tient est plongé brusquement dans l'eau bouillante pendant une minute. La solution sulfurique repasse à la phase liquide; elle est décantée dans une fiole jaugée de 100 cc. puis on fait passer les fragments de muscle encore partiellement congelés dans un petit mortier pour les broyer rapidement. Le contenu du mortier est introduit à son tour dans la fiole jaugée en s'aidant au besoin d'une pince de brucelles pour faire pénétrer dans la fiole les fragments les plus rebelles au passage de son col. Les protides sont alors éliminés par défécation mercurielle de la façon suivante : on ajoute dans la fiole 8 cc. d'une solution à 40 % d'azotate mercurique et quelques gouttes d'une suspension aqueuse de phénolphtaléine, puis on verse goutte à goutte et lentement, tandis que la fiole est agitée, une solution aqueuse de soude à 15 % jusqu'à coloration nettement rouge de tout le milieu. On revient ensuite à la neutralité à l'aide d'acide sulfurique dilué ; on ajuste à 100 cc. et on agite. La fiole est laissée au repos une dizaine de minutes, puis on filtre dans une fiole jaugée de 50 cc. Pour précipiter les glucides, les 50 cc. de filtrat sont alors transvasés dans une fiole jaugée de 100 cc. ; on ajoute 25 cc. de lait de chaux à 10 % et 15 cc. d'une solution de sulfate de cuivre à 20 % ; on ajuste à 100 cc. avec de l'eau et après 24 heures de repos, on filtre. C'est dans le filtrat que l'acide lactique est dosé par la technique de CLAUSEN. Le volume du filtrat est un peu supérieur à 50 cc., ce qui permet de disposer de deux prises d'essais de 25 cc.

2) DOSAGE (CLAUSEN)

Les *liqueurs titrées* et *réactifs* suivants sont nécessaires :

1° Solution sulfurique de sulfate de manganèse.

Acide sulfurique pur. 10 gr.

Sulfate de manganèse. 1 gr.

Eau distillée q. s. p. 100 cc.

2° Solution de permanganate de potassium N/200 conte-

nant 0,5 % d'acide sulfurique. Cette solution sera renouvelée assez souvent. Elle sera préparée par dilution d'une solution de permanganate de potassium N/10 beaucoup plus stable. On la conservera en flacon bouché à l'émeri à l'abri de la lumière.

3° Solution de bisulfite de sodium N/100.

Cette solution très altérable sera toujours préparée extemporanément par dilution d'une solution N/10 qui devra être elle-même assez récente. Il n'est pas nécessaire que son titre soit très rigoureusement exact. On diluera donc au 1/10 une solution très approximativement N/10 obtenue en dissolvant simplement 0 gr. 52 de bisulfite de sodium dans 100 cc. d'eau distillée.

4° Solutions d'iode N/10 et N/100.

Le titre de ces solutions devra être d'une exactitude absolue. La solution N/100 sera préparée par dilution au 1/10 de la solution N/10 au moyen d'une solution d'iodure de potassium à 25 %, cette addition d'iodure ayant pour but de rendre la liqueur plus stable. Il sera bon cependant de la renouveler tous les mois.

La solution N/10 sera préparée selon les données classiques en pesant à un centigramme près 12 gr. 75 d'iode purifié par sublimation que l'on introduit dans une fiole jaugée de 100 cc. avec 25 grammes d'iodure de potassium et 25 à 27 cc. d'eau. On agite jusqu'à dissolution complète puis on ajoute de l'eau distillée jusqu'à 1.000 cc. Vérification est faite avec une liqueur titrée d'hyposulfite de sodium ou une liqueur tirée arsénieuse ou du sulfate d'hydrazine pur (méthode de CATTELAIN). En flacons émeri bien bouchés et pleins, maintenus en lieu frais, la conservation est à peu près indéfinie.

5° Empois d'amidon à 2 % préparé extemporanément.

6° Solution saturée de bicarbonate de soude.

7° Solution étalon de lactate de zinc.

Lactate de zinc cristallisé pur ($C^3H^5O^3$) ₂ Zn, 3 OH ²	0 gr. 33
Eau distillée.	200 cc.

Le lactate de zinc cristallisé pur est pesé à un milligramme

près. Un centimètre cube de cette solution correspond à un milligramme d'acide lactique.

L'appareillage sera constitué comme suit :

Un ballon à distillation de 200 cc. est placé dans un bain-marie à niveau constant contenant une solution sursaturée de chlorure de sodium. Le niveau constant est assuré par le dispositif classique d'un ballon de deux litres rempli d'eau, renversé et dont le col est prolongé par un tube de gros diamètre qui plonge dans le bain un peu au-dessous du niveau du liquide. Si, par suite de l'évaporation celui-ci vient à baisser en dessous du tube, l'eau du ballon tombe librement et le rétablit jusqu'à ce que le tube plonge à nouveau.

Le tube de dégagement du ballon à distillation est relié à deux flacons laveurs tandis que son col est obturé par un bouchon de caoutchouc traversé par un tube vertical dont l'extrémité inférieure qui descend jusqu'au fond du ballon est effilée alors que l'extrémité supérieure légèrement évasée peut recevoir une ampoule entonnoir.

Cette ampoule entonnoir a une douille effilée et calibrée de telle sorte que son débit avec la solution sulfurique de permanganate N/200 soit un peu inférieur à 1 cc. par minute. A notre avis, le débit optimum est même de 1/2 cc. par minute. Il est facile de réaliser soi-même une telle ampoule en étirant par le milieu un gros tube à essai à la façon d'une pipette Pasteur. En sectionnant progressivement la partie effilée avec de petits ciseaux, on arrive par tâtonnements, à obtenir le débit désiré.

Les deux flacons laveurs reliés en série peuvent être constitués par des erlenmeyer de 250 cc. à large ouverture ou mieux, par de gros tubes à fond plat, ou des flacons du type poudrier, obturés par des bouchons de caoutchouc que traversent les tubes d'admission et de dégagement. Les tubes d'admission destinés à plonger dans la solution absorbante sont finement effilés et le tube de dégagement du deuxième flacon laveur est relié à une trompe à eau par un tube de

caoutchouc dont la section peut être graduellement diminuée au moyen d'une pince de Mohr.

Précisons maintenant la technique à mettre en œuvre :

25 cc. de filtrat de défécation sont introduits dans le ballon à distillation avec 2 cc. 5 de la solution sulfurique de sulfate de manganèse.

Les flacons laveurs reçoivent chacun 30 cc. de bisulfite N/100, les connections sont établies sauf celle de la trompe. On chauffe le bain-marie. Quand celui-ci est en complète ébullition, on vérifie sa température qui doit être de 108°. La trompe est alors connectée et mise en marche de façon à ce que tout l'appareil soit traversé par un courant d'air qui doit produire dans les absorbeurs un chapelet de fines bulles nettement séparées les unes des autres.

On arrive à ce résultat en faisant débiter à la trompe un peu plus qu'elle ne devrait et en freinant le courant d'air au moyen de la pince de Mohr. L'ampoule entonnoir est remplie de permanganate N/200 à 0,5 % d'acide sulfurique, et mise en place. A partir de cet instant, l'appareil est en complet fonctionnement, il faut le surveiller jusqu'à ce que l'oxydation soit terminée. La fin de l'oxydation est marquée par l'apparition d'une teinte rose persistante dans le ballon, le permanganate qui affuse n'étant plus décoloré.

L'opération dure en général 3/4 d'heure à une heure. On veillera pendant toute cette durée à ce que le niveau du permanganate ne varie pas trop dans l'ampoule pour que son débit soit le plus régulier possible. On s'assurera constamment que le courant gazeux a une vitesse convenable. Enfin, on vérifiera la température du bain-marie qui doit être rigoureusement constante. Lorsque l'oxydation est terminée, l'admission du permanganate est supprimée mais il est bon de laisser l'appareil en fonctionnement pendant cinq minutes encore en activant un peu le courant d'air de façon à entraîner intégralement dans le bisulfite tout l'acétaldéhyde qui a pris naissance dans le ballon. Les flacons laveurs sont séparés de celui-ci et débouchés tandis que leurs tubes sont en-

core reliés à la trompe qui aspire toujours (ceci a pour effet d'éviter la montée par capillarité de la solution bisulfite dans les effilures). Le contenu des flacons laveurs est réuni avec soin par rinçage à la pissette dans un verre à pied de 250 cc. où le bisulfite non combiné à l'aldéhyde est oxydé pour commencer par la solution d'iode N/10. Il faut la verser lentement, goutte à goutte avec une pipette tandis qu'on agite. Quand la teinte jaune de l'iode tombant dans le bisulfite disparaît moins rapidement, on verse 1 cc. d'empois d'amidon et on continue à ajouter l'iode goutte à goutte avec précaution. Dès qu'une teinte bleue fugace envahissant tout le verre apparaît au contact d'une goutte d'iode N/10, il est temps de terminer l'oxydation par l'iode N/100 jusqu'à ce que l'apport d'une seule goutte de cette solution produise une coloration bleue persistante. Il ne faut à aucun prix dépasser la quantité d'iode strictement nécessaire pour obtenir ce virage car on ne peut revenir en arrière par l'emploi d'un volume connu de bisulfite N/100 par exemple, l'empois d'amidon n'étant plus dans ce cas un indicateur suffisamment souple.

On pourrait, pour obvier à cet inconvénient, substituer à l'empois un peu de chloroforme qui, caplant le plus léger excès d'iode en se colorant en rouge constitue un excellent indicateur souple et sensible. Mais il faudrait opérer dans un flacon de 300 cc. environ bouchant à l'émeri pour permettre une agitation convenable du mélange entre chaque apport d'iode. Vu le grand volume de liquide, cette opération est très longue. Nous préférons faire un virage correct au premier essai avec l'empois ; on conçoit dans ce cas l'utilité d'opérer dans un verre à pied et non dans un vase à précipiter par exemple, une seule goutte d'iode N/10 oubliée sur les parois pouvant fausser considérablement les résultats.

30 cc. de la solution saturée de bicarbonate de sodium sont alors ajoutés, la coloration bleue disparaît. Il ne reste plus qu'à titrer à la burette avec de l'iode N/100 le bisulfite progressivement libéré de sa combinaison aldéhydique jusqu'à coloration bleu violet persistante.

Le nombre n de centimètres cubes d'iode versés multiplié

par 0,45 donne théoriquement le poids en milligrammes d'acide lactique contenu dans les 25 cc. de filtrat analysé. Mais ainsi que nous l'avons exposé au chapitre précédent, les essais en solution pure ne permettent de retrouver en moyenne que 96,7 % de l'acide lactique introduit dans l'appareil.

Il est donc pratiquement plus précis de recommencer l'opération avec, par exemple, 5 cc. de la solution étalon de lactate de zinc correspondant à 5 milligrammes d'acide lactique.

Soit n' le nombre de cc. d'iode versés dans cet essai, la teneur en milligrammes d'acide lactique des 25 cc. de filtrat

sera égale à $\frac{n \times 5}{n'}$; n' est en moyenne égal à 10 cc. 75 (alors

que, théoriquement, il devrait être égal à $\frac{5}{0,45} = 11$ cc. 11.

C. Composés phosphoriques et phosphore total acidosoluble

1. DÉFÉCATION

L'extraction trichloracétique ayant l'avantage d'éliminer les protides, il n'y a pas lieu d'envisager d'autre défécation.

2. DOSAGE (FISKE et SUBBAROW).

On préparera les réactifs ci-après :

1. — Réactif sulfomolybdique.

Dissoudre 25 gr. de molybdate d'ammonium dans 200 cc. d'eau, puis transvaser dans une fiole d'un litre contenant 500 cc. d'acide sulfurique 10 N. Compléter avec de l'eau.

2. — Réactif aminonaphtolsulfonique :

Acide 1. 2. 4. aminonaphtolsulfonique purifié. . . 0 gr. 25

Bisulfite de sodium à 15 % 95 cc.

Ajouter la quantité juste nécessaire de sulfite de sodium à 20 % pour amener la dissolution.

L'acide 1. 2. 4. aminonaphtolsulfonique n'existant pas dans le commerce en France, sera préparé selon les indications que donne FOLIN (75). Cet auteur a été, en effet, amené à préparer ce corps en faisant la synthèse de l'acide 1. 2. 4. naphtoquinonesulfonique. Nous allons préciser ici les doses et le matériel que nous avons employé pour préparer un peu plus de 30 gr. de produit pur.

Faire dissoudre dans un mortier 25 gr. de naphtol β dans 75 gr. de soude à 10 %. Agiter un quart d'heure jusqu'à complète dissolution. D'autre part, dans un becher de un litre, faire dissoudre 12 à 13 gr. de nitrite de soude dans 150 cc. d'eau. Verser le contenu du mortier dans le becher, rincer le mortier avec environ 100 cc. d'eau qu'on verse dans le becher dans lequel on ajoute 200 gr. de glace pilée. Remplir alors une éprouvette de 50 cc. avec de l'acide sulfurique à 10 % sortant de la glacière, verser cet acide doucement le long de la paroi du becher, tandis qu'on agite vigoureusement la mixture. Agiter encore une à deux minutes et remplir à nouveau l'éprouvette trois fois, de façon à verser en tout 200 cc. d'acide sulfurique à 10 %.

Attendre une heure. On obtient une pâte semi-solide qu'on filtre sur entonnoir de Buchner (un entonnoir pour fiole à vide de un litre convient parfaitement). Laver avec 375 cc. d'eau froide environ.

Epanouir alors le précipité dans une grande cuvette photographique (24×30) et le saupoudrer avec 25 gr. de bisulfite de sodium et 12 gr. 50 de sulfite de sodium, en remuant avec un agitateur à l'extrémité aplatie en forme de cuillère. La mixture devient liquide. On filtre immédiatement sur un entonnoir de Buchner plus petit. Il y a un petit résidu noir sur le filtre qu'on lave avec un peu d'eau. On transvase le filtrat et son eau de lavage dans une bouteille brune de 1.250 cc. environ, contenant 500 cc. d'eau et 125 cc. d'acide chlorhydrique concentré. On la couvre d'un entonnoir et on la laisse à l'obscurité complète pendant trente-six heures. Au bout de ce temps, la liqueur est filtrée sur un entonnoir de Buchner de 12 cm. sous vide modéré, et on lave avec environ 500 cc. d'eau froide. En-

fin, le lavage est terminé avec de l'alcool à 90° jusqu'à ce que celui-ci passe incolore. Le contenu du filtre est de l'acide 1. 2. 4. aminonaphtolsulfonique qu'on sèche et qu'on conserve à l'obscurité.

3. — Acide chlorhydrique 2 N.

4. — Acide sulfurique 10 N.

5. — Eau oxygénée à 100 volumes.

6. — Solution étalon de phosphate monopotassique s. l. f.;

Phosphate monopotassique pur cristallisé

(PO_4KH_2). 0 gr. 3509

Acide sulfurique 10 N 10 cc.

Eau distillée, q. s. p. 1000 cc.

5 cc. de cette solution correspondent à 0,4 milligramme de phosphore.

Précisons maintenant la technique spéciale à employer dans chacun des cas :

1. *Orthophosphates*. — Le précipité de phosphate ammoniacomagnésien demande quarante-huit heures à se former complètement. Il est au bout de ce temps séparé et lavé par centrifugation avec une solution d'ammoniaque à 3 % (là encore une centrifugeuse à main est suffisante). On le dissout dans le tube à centrifuger dans 10 cc. du réactif sulfomolybdique et on refait passer la solution dans la fiole qui a servi à la précipitation. Dans une fiole identique, on place 5 cc. de la solution étalon de phosphate monopotassique ; on y ajoute 10 cc. de réactif sulfomolybdique. Puis les deux fioles reçoivent chacune 70 cc. d'eau, 4 cc. du réactif aminonaphtolsulfonique et sont ajustées à 100 cc. avec de l'eau. Elles sont placées au bain-marie à 37° pendant dix minutes durant lesquelles la coloration bleue se développe. Après refroidissement, on compare au colorimètre de Dubosq. Dans tous nos dosages, nous avons toujours fait trois lectures en plaçant le tube étalon sous les trois hauteurs suivantes : 45 mm., 40 mm., 30 mm. Dans ces conditions, si le tube-analyse est vu sous les hauteurs respectives exprimées en millimètres : h, h', h'' à égalité de teinte,

la teneur en mmgr. de phosphore des 7 cc. de prise d'essai de la liqueur d'extraction est égale à :

$$0,4 \times \frac{115}{h+h'+h''}$$

2. *Acide créatine-phosphorique.* — Il suffit d'abandonner 5 cc. de l'extrait trichloracétique en présence de 10 cc. de réactif sulfomolybdique pendant un quart d'heure à la température du laboratoire, dans une fiole jaugée de 100 cc. En continuant le dosage comme précédemment, on obtient le phosphore contenu dans la prise d'essai, correspondant à la somme orthophosphates + acide créatine-phosphorique.

3. *Acide adénylpyrophosphorique.* — 4 cc. de l'extrait trichloracétique sont placés dans une fiole jaugée de 100 cc. avec 4 cc. d'acide chlorhydrique 2 N. La fiole est portée au bain-marie bouillant pendant 7 minutes exactement. Elle est ensuite refroidie sous un courant d'eau et le dosage est continué comme précédemment. On obtient le phosphore de la prise d'essai correspondant à la somme orthophosphates + acide créatine-phosphorique + acide adénylpyrophosphorique.

4. *Esters dits facilement hydrolysables.* — On place 3 cc. de l'extrait trichloracétique dans une fiole jaugée de 100 cc. avec 3 cc. d'acide chlorhydrique 2 N. La fiole est portée au bain-marie bouillant pendant 3 heures. Après refroidissement le dosage continué comme précédemment donne le phosphore de la prise d'essai correspondant à la somme orthophosphates + acide créatine-phosphorique + acide adénylpyrophosphorique + esters facilement hydrolysables.

5. *Phosphore total acidosoluble.* — On place 2 cc. de l'extrait trichloracétique dans un matras dit de microkjeldahl, en pyrex, avec 1 cc. d'acide sulfurique 10 N. On fait bouillir pour évaporer l'eau ; deux perles de verre régularisent l'ébullition. L'emploi d'un support universel est pratique pour donner au tube une inclinaison convenable et régler sa distance à la flamme de façon à assurer une ébullition tranquille. Lorsque l'apparition nette de fumées blanches d'anhydride sulfurique

indique que toute l'eau est évaporée, on cesse de chauffer pour ajouter après refroidissement I goutte ou II d'eau oxygénée à 100 volumes. L'ébullition est alors conduite de nouveau avec modération, de façon à s'opposer le plus possible au départ d'anhydride sulfurique. A cet effet, le matras est coiffé d'une ampoule pédiculée. Au bout d'un quart d'heure, la minéralisation est terminée ; on cesse le feu et on abandonne le matras au refroidissement. Pendant toute la durée de la minéralisation, il ne faut pas quitter l'appareil des yeux de façon à prévenir toute ébullition tumultueuse.

Lorsque le matras est suffisamment refroidi, on y verse quelques centimètres cubes d'eau tiède, puis on fait passer intégralement son contenu dans une fiole jaugée de 100 cc. par rinçages à la pissette. Le dosage continué comme précédemment donne le phosphore total acidosoluble contenu dans les 2 cc. de prise d'essai. On vérifiera que l'eau oxygénée a bien été détruite en ajoutant le réactif sulfomolybdique. S'il subsistait, en effet, de l'eau oxygénée, celui-ci présenterait une coloration jaune par formation d'acide permolybdique [DENIGES (47)]. Il va sans dire que, dans une minéralisation correcte, cette coloration ne doit pas se produire.

Nécessité éventuelle et calcul d'une correction à faire

Tous ces dosages ont été supposés faits avec de l'acide trichloracétique pur, exempt de phosphates, produit facile à trouver. Il convient cependant de s'en assurer et de déterminer la correction à faire au cas où on trouverait des traces de phosphates. A cet effet, nous proposons le procédé suivant : Disposer de trois fioles jaugées de 100 cc., identiques par la forme, qui seront placées sur une feuille de papier blanc. Dans la première, mettre 80 cc. d'eau distillée; dans la seconde 10 cc. de réactif sulfomolybdique et 80 cc. d'eau distillée ; dans la troisième 10 cc. de la solution d'acide trichloracétique à 10 % à essayer (et qui a servi également à préparer la solution à 4 %), 10 cc. de réactif sulfomolybdique, 80 cc. d'eau distillée; enfin ajouter dans chaque fiole 4 cc. de réactif aminonaphtol-sulfonique. Porter les fioles 5 minutes au bain-marie à 37°, les

ramener sur la feuille de papier blanc. Aucune des fioles ne doit présenter la moindre trace de coloration bleue. Si cette éventualité se produisait dans la troisième fiole, c'est que des phosphates se trouveraient dans l'acide trichloracétique. Il suffirait alors de verser dans la fiole 2 à raison d'une goutte toutes les minutes, de la solution étalon de phosphate (5 cc. = 0,4 mgr. de P) jusqu'à égalité de teinte dans les fioles 2 et 3. En versant ces gouttes à l'aide d'une pipette graduée au 1/10 de cc., il est facile de déduire la quantité de phosphore versé pour calculer la correction à faire dans chaque dosage avec un tel acide trichloracétique.

Pour fixer les idées, supposons que nous ayons versé 5/10 de cc. Dans ce cas, 1 gr. d'acide trichloracétique contiendra 0,04 mgr. de P. En ayant soin de mesurer le volume des liqueurs trichloracétiques utilisées lors de l'extraction, on pourra calculer la teneur de l'extrait en acide. Par exemple, l'emploi de 40 cc. de liqueur à 10 % et de 70 cc. de liqueur à 4 % donne dans un extrait ajusté à 150 cc. un pourcentage de 4,5 % d'acide. Appliquant la correction au dosage des orthophosphates, il intervient dans la prise d'essai de 7 cc., 0 gr. 315 d'acide qui apportent 0 mgr. 012 de P, chiffre à retrancher du résultat concernant la prise d'essai.

Si, ce qui est le cas le plus fréquent, la troisième fiole ne bleuit pas, verser simultanément dans les fioles 2 et 3, 2 cc. de la solution étalon de phosphate à raison de 1/10 de cc. toutes les 15 secondes. On constatera que la coloration se développe dans le temps exactement de la même façon dans les deux fioles. Les 2 cc. étant versés, on remet les fioles 2 et 3 au bain-marie pendant 5 minutes à 37° ; on laisse refroidir et on examine au colorimètre sous 80 millimètres. Les hauteurs lues doivent être les mêmes dans les deux tubes à égalité de teinte.

Si, par hasard, la hauteur du liquide contenant l'acide trichloracétique est plus élevée, c'est que cet acide peut contenir l'impureté signalée par FISKE et SUBBAROW, impureté dont nous avons parlé au chapitre II. Elle gêne le développement de la coloration, mais comme il est impossible d'évaluer la correction à faire, un tel acide est à rejeter.



Pour terminer, indiquons l'ordre dans lequel il convient d'entreprendre toutes les manipulations pour ne pas perdre de temps. Le prélèvement destiné au dosage de l'acide lactique étant à la glacière, le ballon à hydrolyse des glucides est installé dans son bain-marie pendant qu'on surveille l'extraction trichloracétique des composés phosphoriques. Dès que celle-ci est terminée et que les orthophosphates sont précipités, le ballon concernant le dosage des esters facilement hydrolysables est placé dans le bain-marie. Deux heures trois quarts après, on entreprendra les dosages d'acide créatinephosphorique et adénylpyrophosphorique ainsi que celui du phosphore total qu'on aura minéralisé une demi-heure auparavant. Ceci permet de distribuer tous les réactifs en série dans les fioles jaugées et de ne préparer qu'une seule fiole étalon pour tous ces dosages de phosphore, à condition toutefois de faire une lecture ininterrompue au colorimètre. Pendant le refroidissement de ces liqueurs, on pratiquera la défécation des prélèvements destinés au dosage de l'acide lactique et des glucides, dosages qui seront faits le lendemain. Les orthophosphates seront dosés le surlendemain.

III. — RESULTATS

Nous avons déterminé successivement le taux des substances glucidiques du muscle de huit pigeons voyageurs (en collaboration avec notre maître LECOQ ⁽¹³⁵⁾), puis de trois groupes de deux cobayes et de deux groupes de cinq rats blancs. Accessoirement, nous avons fait le même travail sur deux pigeons paons et sur deux lapins.

Nos résultats ont été groupés avec leurs moyennes dans les tableaux qui vont suivre afin de pouvoir les discuter en appréciant leurs variations d'un animal à l'autre pour une espèce déterminée et nous avons personnellement jugé utile d'y ajouter le calcul de rapports phosphoriques.

Tableau I
Pigeons voyageurs.

N° des pigeons	1	2	3	4	5	6	7	8	Moyen- nes
Glucides totaux	189	141	140	166	130	111	120	151	143
Acide lactique	167	194	208	187	240	261	248	255	220
Orthophosphates	80	105	81,6	80	83,5	86	83	79	85
Acide créatine- phosphorique	19	16	11,4	17	6,5	4	14,8	8	12
Acide adénylpyro- phosphorique	26	29	26	24	30	21	23	24	27
Esters facilement hydrolysables	23	16	26	25	16	11	16	15	18
Phosphore total acidosoluble	206	222	156	160	160	153	165	162	173
Orthophosphates phosphore total x100	36,8	47,2	52,3	50	52,1	56,2	50,3	48,7	49,4
Acide créatine phosphorique x100 phosphore total	9,2	7,2	7,3	10,6	4	2,6	9	4,9	6,8
Acide adénylphos- phorique x 100 phosphore total	12,6	13	16,6	15	18,7	13,7	13,9	14,8	14,8
Esters facilement hydrolysables x100 phosphore total	11,1	7,2	16,6	15,6	10	7,1	9,6	9,2	10,8

Tableau II
Cobayes.

N° des cobayes	1 et 2	3 et 4	5 et 6	moyennes
Glucides totaux	196	189	197	194
Acide lactique	169	192	182	181
Orthophosphates	72	75	69	72
Acide créatinephosphorique	20	20	14	18
Acide adénylpyrophosphorique ..	35	33	34	34
Esters facilement hydrolysables.	24	20	23	23
Phosphore total acidosoluble...	185	171	190	182
Orthophosphates x 100	38,9	43,8	36,3	39,5
Phosphore total				
Acide créatinephosphorique x100 phosphore total	10,8	11,6	7,3	9,9
Acide adénylpyrophosphorique x100 Phosphore total	18,9	19,2	17,6	18,6
Esters facilement hydrolysables x 100	12,9	11,6	13,1	12,5
Phosphore total				

Tableau III
Rats blancs.

N° des rats	1 à 5	6 à 10	moyennes
Glucides totaux	137	150	143,5
Acide lactique,.....	239	248	243
Orthophosphates	71	68	69,5
Acide créatinephosphorique	18	15	16,5
Acide adénylpyrophosphorique	35	30	32,5
Esters facilement hydrolysables..	19	17	18
Phosphore total acidosoluble.....	193	189	191
Orthophosphates x 100	36,7	35,9	36,3
Phosphore total			
Acide créatinephosphorique x 100	9,3	7,9	8,6
Phosphore total			
Acide adénylpyro- phosphorique x 100	18,1	15,8	16,9
Phosphore total			
Esters facilement hydrolysables x 100	9,8	8,9	9,4
Phosphore total			

Tableau IV
Pigeons-paons et lapins.

N° des animaux	Pigeons-paons			Lapins		
	1	2	moyennes	1	2	moyennes
Glucides totaux	189	181	185	163	169	166
Acide lactique	301	283	292	248	226	237
Orthophosphates	75	81	78	69	65	67
Acide créatinephosphorique	6	12	9	23	23	23
Acide adénylpyrophosphorique ..	27	25	26	32	38	35
Esters facilement hydrolysables..	10	14	12	28	24	26
Phosphore total acidosoluble...	190	164	177	189	201	195
Orthophosphates x 100	39,4	49,3	44,3	36,5	32,3	34,4
Phosphore total						
Acide créatine phosphorique x 100	3,1	7,3	5,2	12,1	11,4	11,7
Phosphore total						
Acide adénylpyro- phosphorique x 100	14,2	15,2	14,7	16,9	18,9	17,9
Phosphore total						
Esters facilement hydrolysables x 100	5,2	8,5	6,8	14,8	11,9	13,8
Phosphore total						

Nous pensons, en effet, que, si la présence d'une portion de phosphore lipidique dans la liqueur d'extraction ne permet pas une appréciation exacte par différence des esters difficilement hydrolysables, cette fraction lipidique joue cependant le rôle d'une quantité négligeable vis-à-vis du taux beaucoup plus élevé du phosphore total acidosoluble. Ce dernier peut, dès lors, être considéré pratiquement comme le phosphore total intervenant dans le métabolisme glucidique du muscle. Il y a une régulation entre tous les composés labiles puisque leur ensemble travaille en cycle fermé. Ils ont donc tous, par rapport au phosphore total, un taux qui doit être à peu près constant, à chaque instant, chez le même animal. Par suite, il devient intéressant d'établir ce taux et d'apprécier sa fixité d'un animal à l'autre. A cet effet, nous l'avons calculé pour cent de phosphore total et joint chaque fois à nos déterminations.

Celles-ci sont exprimées en milligrammes pour cent grammes de muscle frais, les composés phosphoriques étant calculés en phosphore.

Si nous examinons successivement les résultats du premier de ces tableaux, nous voyons que, chez le pigeon voyageur, les glucides totaux présentent au maximum une différence de 41 % du chiffre le plus fort trouvé. L'acide lactique apparaît un peu plus stable, le plus grand écart observé étant de 36 % seulement. Les orthophosphates et le phosphore total sont les éléments les plus fixes puisqu'ils atteignent au plus, respectivement 24 et 30 % de différence. Leur rapport également ne varie jamais de plus de 30 %. Il y a même lieu de remarquer que tous les chiffres sauf un se groupent entre 38,8 et 52,3, ce qui, en éliminant le résultat le plus éloigné, abaisse l'écart à 25 %. Le rapport de l'acide adénylpyrophosphorique au phosphore total apparaît encore moins variable (24 % de différence maxima).

Par contre, le rapport de l'acide créatinephosphorique au phosphore total atteint des différences allant jusqu'à 75 % et celui des esters facilement hydrolysables accuse un écart de 57 %.

En résumé, il apparaît que, si chez le pigeon, les esters faci-

lement hydrolysables et l'acide créatinephosphorique sont des éléments assez variables d'un animal à l'autre, le phosphore total acidosoluble, l'acide orthophosphorique et l'acide adénylpyrophosphorique sont des éléments relativement fixes. L'acide lactique et les composés réducteurs glucidiques totaux, quoique oscillant entre des limites plus étendues, restent encore très comparables.

Les chiffres des tableaux concernant les cobayes et les rats blancs ont une fixité beaucoup plus grande puisqu'ils se rapportent non plus à un seul animal, mais à la moyenne de plusieurs.

C'est ainsi que, pour les cobayes, les chiffres extrêmes accusent une différence de 11 % pour l'acide lactique et de 4 % seulement pour les composés glucidiques.

Le phosphore total varie au maximum de 10 %, et, parmi les composés phosphoriques, si les différences extrêmes atteignent 30 et 20 % dans les cas respectifs de l'acide créatinephosphorique et des esters facilement hydrolysables, les orthophosphates et l'acide adénylpyrophosphorique sont remarquablement fixes, variant au plus de 8 et de 5,7 % d'un groupe à l'autre. Comme chaque groupe n'est formé que de deux animaux, on voit que le muscle de cobaye est particulièrement stable.

Les moyennes des deux groupes de 5 rats présentent peu d'écart. Comme dans les autres espèces d'animaux, c'est encore l'acide créatinephosphorique qui est le moins stable. Il accuse une différence de 16 % d'un groupe à l'autre. L'acide adénylpyrophosphorique 14 % et les esters facilement hydrolysables 10 % seulement.

De bonnes fixités s'observent pour l'acide lactique, les glucides totaux, les orthophosphates, les différences constatées s'échelonnant entre 3,6 et 8,6 %. La fixité du phosphore total acidosoluble et du rapport des orthophosphates à celui-ci est remarquable (2 % d'écart).

Il est certain que, s'il devait exister d'un animal à l'autre des différences notables, on n'observerait pas cette similitude de résultats dans les deux groupes.

On voit donc, en définitive, que l'analyse de muscles déterminés dans chacune de ces trois catégories d'animaux de laboratoire : pigeons voyageurs, rats blancs, cobayes, donne en général des résultats suffisamment comparables d'un animal à l'autre pour permettre l'établissement de moyennes représentatives de l'espèce et même de la race étudiées. Aussi, nous avons calculé et fait figurer ces moyennes dans nos tableaux dans le but de les rapprocher plus loin des résultats que nous trouverons au cours des carences.

Nos résultats concernant le pigeon-paon et le lapin ne seront pas utilisés. Nous les donnons simplement à titre documentaire.

Toutefois, nous ne croyons pas inutile de souligner la différence de composition observée entre le muscle du pigeon voyageur et celui du pigeon-paon. Chez ce dernier animal, l'acide lactique musculaire a un taux beaucoup plus élevé que chez le pigeon voyageur, alors que les taux des autres substances glucidiques sont tout à fait comparables dans les deux races. A notre avis, il est probable que l'élévation de l'acide lactique dans les pectoraux du pigeon-paon est en relation avec le tremblement quasi incessant qui l'agite. Pour cette raison, l'emploi du pigeon-paon comme animal d'expérience nous paraît à déconseiller.

CHAPITRE IV

LES VITAMINES, LEUR MISE EN EVIDENCE, LEUR STRUCTURE CHIMIQUE

A la fin du XIX^e siècle, les données de l'analyse chimique associées à celle de la thermodynamique avaient jeté un jour nouveau sur le problème de l'alimentation.

Les physiologistes avaient pu constater que seule la partie organique des aliments est dynamique, et, malgré sa grande complexité, ils avaient pu la ramener à trois groupes chimiques de substances :

Albumines, sucres et graisses.

Les besoins quantitatifs de l'organisme pouvaient pour chacun de ces groupes être déterminés par une commune mesure : la calorie, les substances d'un même groupe paraissant isodynamiques. Il semblait donc qu'inversement on ait pu constituer des régimes synthétiques satisfaisants au point de vue énergétique en établissant des mélanges en proportions définies de substances organiques purifiées. Il aurait suffi d'ajouter les sels et l'eau indispensables pour réaliser une synthèse alimentaire pouvant avoir des conséquences pratiques considérables.

On aurait eu là, en effet, une nourriture peu encombrante difficilement altérable et exempte de microbes.

De nombreuses tentatives furent faites dans ce sens au début de ce siècle, sans aucun succès cependant.

I. — Mise en évidence des vitamines

Dès 1906, HOPKINS constatait qu'aucun animal ne pouvait vivre avec un mélange composé de matières protéiques pures,

de matières grasses et d'hydrates de carbone, et que même si les substances minérales étaient présentes, l'animal ne pouvait pas se développer. Il y avait donc « quelque chose » qui manquait à ces régimes, pour qu'ils soient satisfaisants.

Malgré cela, les chercheurs continuaient sans succès à essayer d'obtenir des régimes synthétiques. OSBORNE et MENDEL, par exemple, signalaient (200) qu'ils ne pouvaient avoir de bons résultats dans la fabrication de régimes synthétiques destinés à alimenter de jeunes rats que s'ils employaient du lait entier. Avec le lait entier, en effet, la croissance était normale. Avec du petit lait désalbuminé le développement était entravé assez rapidement, et avec un mélange de matières minérales constituant du petit lait artificiel, le ralentissement de la croissance était encore plus précoce.

De telles expériences montraient bien qu'un ou plusieurs éléments indispensables échappaient à la connaissance des investigateurs.

Cependant Gabriel BERTRAND, le premier, avait eu l'idée de la présence nécessaire d'infiniment petits chimiques indispensables, ses recherches initiales sur le manganèse de la laccase l'ayant conduit à se spécialiser dans l'étude d'éléments minéraux qu'il rencontra à doses infinitésimales dans les tissus animaux ou végétaux, et dont le rôle catalytique fut par la suite mis à jour.

C. FUNK, ancien élève de G. BERTRAND, comprit toute l'importance de cette idée d'infiniments petits chimiques. Il entreprit alors d'isoler la substance curatrice du béribéri, maladie qu'on rattachait à une carence alimentaire à la suite des observations d'EIJKMANN. EIJKMANN (61) en 1897 avait constaté en effet que des volailles nourries au riz poli (c'est-à-dire privé par glaçage de son enveloppe) contractaient une maladie nerveuse analogue au béribéri : la polynévrite aviaire. En ajoutant au riz poli les produits de décortication du grain, ou encore en substituant le riz entier au riz poli, les animaux guérissaient.

En épuisant le son de riz par l'alcool, FRASER et STANTON avaient obtenu en 1907 un extrait qui donnait de bons résultats dans le traitement du béribéri.

C. FUNK (81) (82) au moyen d'épuisements, de précipitations et de fractionnement divers, en partant de 50 kilogs de riz obtint 0 gr. 40 d'une substance organique qu'il nomma *vitamine*. Cette substance se révélait extrêmement active puisqu'un milligramme par exemple suffisait amplement à guérir un pigeon rendu polynévritique, soit par le riz glacé, soit par un régime synthétique purifié. Ainsi apparaissait dans un régime la nécessité d'un infiniment petit chimique *organique*. C. FUNK eut le mérite d'étendre dès cette époque cette notion en reconnaissant l'existence d'autres vitamines. Il montra que diverses maladies rattachées jusqu'alors à une carence alimentaire imprécise, étaient dues à l'absence de vitamines spécifiques, et il groupa ces maladies sous le nom d'*avitaminoses*.

La vitamine initiale de FUNK prit place dans la série sous le nom de vitamine B. A la suite de cette découverte, WEILL et MOURIQUAND (274) entreprirent de nouvelles recherches sur la polynévrite qu'ils reproduisirent par la suite avec MICHEL (177) au moyen de diverses graines décortiquées ou stérilisées.

Parmi les études relatives aux carences alimentaires, les plus anciennement connues concernent le scorbut.

Dès 1671, un français, Nicolas VENETTE, montra que cette maladie qui décimait les navigateurs, était due à l'absence de végétaux frais dans l'alimentation, et il préconisa pour la guérir l'emploi de rapure d'orange ou de citron.

En 1895, Théobald SMITH (256) constatait que des cobayes nourris de graines de céréales et d'eau mouraient à la suite d'abondantes hémorragies.

Dix ans plus tard, HOLST et FROLICH (104) établirent que les lésions observées étaient identiques à celles du scorbut humain, et que des aliments frais produisaient une amélioration de l'état général des animaux en expérience. Ils conclurent à l'existence d'une substance spécifique antiscorbutique, que FUNK classa à ce moment-là dans le groupe des vitamines.

La maladie n'ayant pu être reproduite chez le rat, on mit cependant cette opinion en doute pendant un certain temps. Faute de trouver un agent pathogène on dut reconnaître qu'il s'agissait bien d'une avitaminose, et DRUMMOND (49) reconnais-

sant l'existence du facteur antiscorbutique lui donna le nom de vitamine C.

Toute une autre série de recherches permit d'autre part de déterminer de nouveaux facteurs de carence contenus dans les matières grasses.

En 1909, STEPP (260) avait constaté que la souris pouvait vivre avec un pain composé de lait et de farine, mais que cette préparation devenait insuffisante après avoir subi une extraction par l'alcool et l'éther en vue d'en éliminer les lipoides.

Puis Mc COLLUM et DAVIS (163) montrèrent que, dans une ration artificielle, les extraits étherés de beurre ou de jaune d'œuf ont une action stimulante sur la croissance que n'ont pas d'autres lipides.

D'autre part, OSBORNE et MENDEL (200), à la suite d'observations dont nous avons déjà parlé, avaient conclu que le facteur indispensable résidait dans la crème de lait. Ils le retrouvèrent à la suite d'autres expériences dans la graisse de beurre et l'huile de foie de morue.

Puis on constata que la carence étudiée tout en entravant le développement des jeunes rats provoquait souvent chez ces animaux une affection oculaire qui fut appelée xérophtalmie. Inversement, le développement redevenait normal, et la xérophtalmie disparaissait en additionnant de beurre ou d'huile de foie de morue les régimes insuffisants.

Le principe actif intervenant dans ces expériences fut désigné sous le nom de facteur A ou facteur de croissance. L'expression plus exacte de vitamine A antixérophtalmique et de développement, est cependant préférable.

FUNK (83) ayant eu l'idée que le rachitisme devait être attribué à une avitaminose, MELLANBY (168), dans le but de le démontrer, réussit à produire expérimentalement cette maladie sur le chien au moyen de régimes appropriés : il crut pouvoir identifier le facteur du rachitisme avec la vitamine A. Par la suite, il devint moins affirmatif. HESS et UNGER (100), puis PATON et WATSON (212) ayant montré que l'absence du facteur A ne provoque pas forcément le rachitisme, et qu'inversement sa présence ne l'évite pas.

Puis SHERMANN et PAPPENHEIMER (252) montrèrent que la carence en ion phosphore jouait un rôle de premier ordre dans la production de cette maladie. Et Mc. COLLUM, SHIPLEY PARK et leurs collaborateurs (166) ayant à leur tour obtenu le rachitisme avec des régimes carencés en facteur A, il fut établi qu'à l'avitaminose A se superposait une insuffisance en phosphore. La guérison était obtenue par l'huile de foie de morue tandis qu'on observait une fixation de sels de chaux sur le squelette. Par la suite, on reconnut que la carence en facteur de développement n'avait pas besoin d'être totale, puisque de petites quantités de beurre favorisaient même le développement du rachitisme, ce qui conduisit à supposer l'existence d'un autre facteur liposoluble en relation avec le rapport phosphore/calcium.

Cette existence fut définitivement confirmée lorsque les travaux de Mc. COLLUM (165) établirent que l'oxydation de l'huile de foie de morue détruisait plus rapidement le facteur anti-xérophthalmique que le facteur antirachitique. Ce dernier fut baptisé vitamine D par les auteurs anglo-saxons.

On était donc en présence de quatre vitamines A, B, C, D.

Depuis une dizaine d'années, des investigations de plus en plus minutieuses sont venues rendre la question beaucoup plus complexe. On a réussi à mettre en évidence l'existence d'un facteur E antistérilité, et d'un facteur K antihémorragique. Parallèlement apparaissait la pluralité des vitamines B et C. La vitamine B se subdivisait en vitamine B₁ (ou B proprement dite), en vitamines B₂, B₃, B₆, H, P-P, etc... ; et la vitamine antiscorbutique initiale en vitamines C et P. Ces différents points sont encore l'objet de discussions.

Les quatre vitamines initiales : A, B, C, D, restent incontestées au milieu de cet ensemble de travaux. Bien mieux, l'analyse chimique et la synthèse organique ont permis d'en avoir une connaissance très précise.

II. — Constitution chimique des vitamines

Les vitamines ont été primitivement divisées en vitamines liposolubles ou vitasterines A et D, et en vitamines hydrosolubles B. et C. Nous suivrons cet ordre pour étudier leur constitution chimique.

VITAMINE A

STEENBOCK et GROSS en 1920 (259) avaient montré que l'activité antixerophthalmique est proportionnelle à la coloration jaune des végétaux, et STEENBOCK et BOUTWELL (258) avaient préparé un extrait de luzerne dont la fraction insaponifiable fut divisée en deux parties, l'une soluble dans l'éther de pétrole contenant les carotènes, et conservant l'action antixerophthalmique, l'autre soluble dans l'alcool contenant les xanthophylles inactive.

Par ailleurs, DRUMMOND et COWARD (52), puis PALMER et KENNEDY (206) ne trouvaient pas de parallélisme entre l'activité vitaminique A et la teneur en carotène de diverses substances.

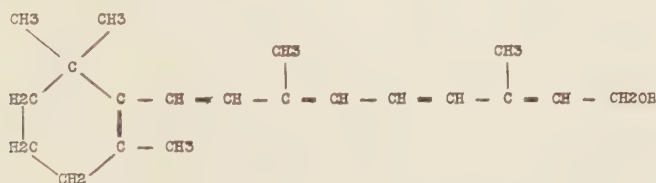
Cependant les expériences de von EULER et de ses collaborateurs (69) montrèrent que le carotène possédait une action vitaminique A puisqu'il suffisait d'en donner quotidiennement 5 à 10 γ pour assurer la croissance des animaux. Cette action restait même le fait de carotènes hautement purifiés.

En 1929 COLLISON et ses collaborateurs (44) obtenaient des résultats semblables à la suite d'expériences analogues. T. MOORE (179) démontrait que le foie du rat carencé alimenté en carotène s'enrichissait en vitamine A, et supposait que ce colorant devait constituer une provitamine A. Et, en 1930 le Professeur JAVILLIER et Mlle EMERIQUE (110) montraient que du carotène d'épinard était doué d'activité vitaminique A et qu'il en était de même du carotène d'ortie. Confirmant encore les résultats d'EULER, DRUMMOND qui jusqu'alors avait maintenu une opinion inverse adoptait la même manière de voir.

KUHN et LEDERER (122), KARRER et ses collaborateurs (115) ont montré que le carotène était un mélange de deux isomères le β optiquement inactif et toujours prépondérant, et l' α carotène optiquement actif. KUHN et BROCKMANN (120) ont trouvé par ailleurs un troisième isomère le γ carotène actif sur la lumière polarisée dans la proportion de 0,1 %.

Sans décrire complètement les formules des trois carotènes nous indiquerons que l' α est formé d'une longue chaîne aliphatique ayant à chaque bout un cycle tétrahydrobenzenique trisubstitué, mais ces deux cycles ne sont pas identiques, ils se différencient par l'emplacement d'une double liaison. Au contraire dans le β carotène ces cycles sont indentiques; quant au γ carotène, s'il possède un cycle à un bout de sa chaîne, à l'autre bout le cycle n'est pas fermé. On comprend alors très bien pourquoi tel caroténoïde est capable d'engendrer plus ou moins de vitamine que tel autre. Le β doit par rupture de sa molécule avec fixation d'eau au milieu de la chaîne donner deux molécules de vitamine A, les α et γ ne pouvant en produire qu'une. Ces transformations auraient lieu bien entendu sous l'action d'une diastase hépatique.

La vitamine A, d'après P. KARRER, répond à la formule de constitution suivante :



VITAMINE D

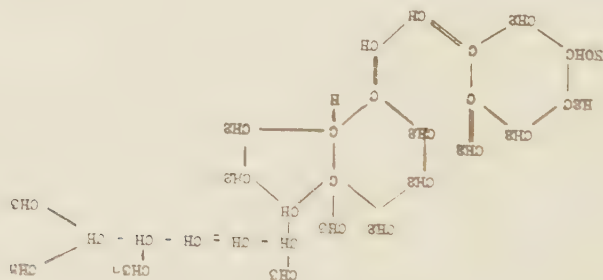
De 1912 à 1919, l'expérience avait montré que le rachitisme pouvait être guéri par la solarisation ou les rayons ultra violets (RACZINSKY, HULDSCHINSKY) aussi bien que par l'huile de foie de morue. C'est en s'appuyant sur ces faits en apparence très disparates qu'on est arrivé à découvrir la nature de la vita-

mine D. ZUCKER, PAPPENHEIMER et BARNETT (279) ayant montré que la vitamine antirachitique était contenue dans la fraction insaponifiable de l'huile de foie de morue, pensèrent qu'elle pouvait être un dérivé du cholestérol. Or en soumettant le cholestérol à l'irradiation ultraviolette, on obtint la formation d'un nouveau composé doué de propriété antirachitiques. Peu après il fut démontré que la substance antirachitique ne provenait pas du cholestérol mais d'une impureté de celui-ci, et ROSENHEIM et WEBSTER précisèrent qu'il s'agissait de l'ergostérol.

L'ergostérol lorsqu'il est irradié subit toute une série de transformations moléculaires, conduisant successivement : au lumistérol, au tachystérol, au calciférol, au toxistérol, et aux suprastérols.

La vitamine D proprement dite est le calciférol obtenu à l'état cristallisé par BOURDILLON, WEBSTER et leurs collaborateurs (10) (11) (12). Une autre substance également antirachitique a été obtenue par WINDAUS (277) et appelée vitamine D₁. Il s'agit d'une combinaison moléculaire de la vitamine D avec le lumistérol c'est pourquoi la vitamine D proprement dite est aussi appelée depuis vitamine D₂.

Sa formule développée est la suivante :



Notons que la vitamine D de l'huile de foie des poissons n'a jamais été isolée ; c'est en irradiant l'ergostérol qu'on est arrivé par voie détournée à établir sa composition.

Cependant on a pu en séparant les stérols des parties neutres des huiles de poissons, enrichir celles-ci jusqu'à 10.000 fois en facteur antirachitique. L'identité des deux facteurs (naturel et synthétique) reste discutée.

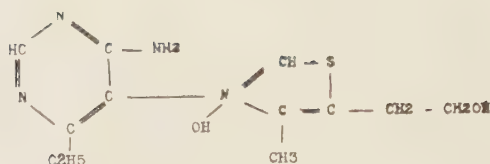
GROUPE DES VITAMINES B

La complexité de la vitamine B est apparue dès l'origine. L'identité de la vitamine de FUNK et du facteur hydrosoluble de Mc. COLLUM et DAVIS n'apparaissant pas démontrée à de nombreux auteurs. MITCHELL, en particulier, établit des différences inexplicables de solubilité de répartition et d'activité. GOLDBERGER mit en évidence la présence d'une vitamine anti-pellagreuse spéciale.

D'autre part, SEIDELL fixa la vitamine proprement antinévrétique au moyen de terre à foulon. A la suite de recherches minutieuses, Mme RANDOIN et LECOQ (221) aboutirent à la caractérisation de trois fractions, l'une antinévrétique, adsorbée par la terre à foulon, l'autre d'utilisation nutritive, thermostable non alcalino-stable, une troisième d'utilisation cellulaire, thermostable et alcalinostable. C'est dans cette dernière fraction, correspondant à la vitamine B₂ qu'ultérieurement a été mise en évidence la présence des flavines; la seconde fraction correspond à la vitamine B₃ de WILLIAMS et WATERMAN; quant au facteur proprement antinévrétique dénommé B₁, il a été obtenu cristallisé par de nombreux auteurs. En définitive les structures chimiques des vitamines B₁ et B₂ ont seules été bien étudiées.

VITAMINE B₁.

La vitamine B₁ ou vitamine B proprement dite a été obtenue cristallisée en 1926 par JANSEN et DONATH. Ces auteurs lui attribuèrent la formule C₆H₁₀N₂O et crurent pouvoir établir une relation entre l'activité antinévrétique de leur produit et la présence d'un noyau pyrimidique dans sa formule. Cependant en 1932, WINDAUS et ses collaborateurs ont constaté que ce corps contenait aussi du soufre et lui ont attribué la formule C₁₂H₁₆N₄OS. A partir de 1934 les travaux des écoles de WINDAUS et de WILLIAMS devaient conduire au schéma proposé par WILLIAMS (276) :

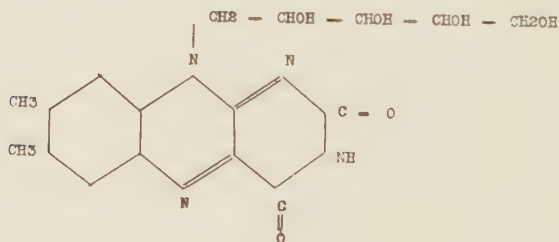


Il reste à déterminer la position du groupe éthyle dans le noyau pyrimidique. D'après WINDAUS (278), il est possible qu'au lieu du groupe éthyle il y ait deux groupes méthyle, car en oxydant le sulfate de vitamine B₁ par le permanganate de baryum on obtient une base diaminée qui pourrait être la diméthyl 2-4-diamino-5-6-pyrimidine.

VITAMINE B₂

O. WARBURG (272) avait découvert en 1932 dans la levure et d'autres cellules, un pigment jaune possédant un pouvoir oxydo-réducteur. En 1933, KUHN, GYORGY et WAGNER JAUREGG (121) identifièrent le facteur B₂ d'utilisation cellulaire au colorant jaune qu'ils isolèrent d'après WARBURG, d'abord de la levure, puis du petit lait, du blanc d'œuf, etc... Ils nommèrent flavines les composés ainsi obtenus. Ces flavines de provenances les plus diverses (lactoflavine du lait, ovoflavine de l'œuf, etc...) avaient une action vitaminique identique. KUHN et ses collaborateurs s'employèrent alors à établir la composition chimique de ces substances.

Voici la formule donnée par KUHN, REINEMUND et WEYGAND pour la lactoflavine :



C'est la 6-7-diméthyl-9-tétraoxy-n-amyl flavine, la flavine étant elle-même une iso-alloxazine.

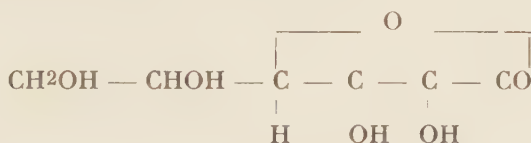
D'après une note publiée par KARRER, SCHOPP et BENZ (116) le sucre contenu dans la vitamine B₂ serait du d-ribose. La synthèse de la riboflavine a été faite et son action vitaminique a été vérifiée par von EULER.

Ainsi la vitamine B₂ identifiée à une flavine, et par suite analogue au pigment de WARBURG semble devoir jouer par sa présence dans l'organisme un rôle d'oxydo-réducteur.

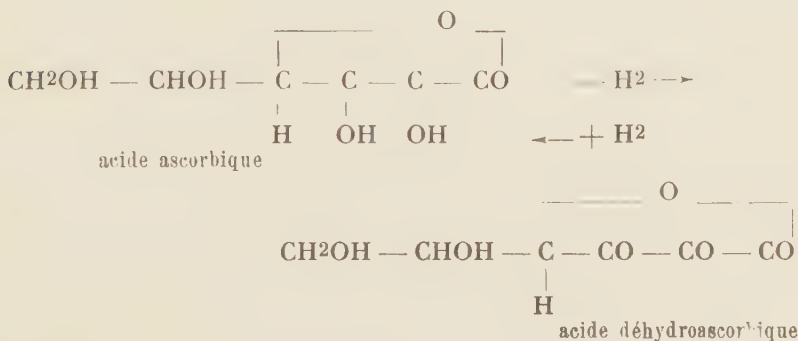
VITAMINE C

En 1928, SZENT-GYORGYI isola de l'écorce des surrénales un corps réducteur auquel il donna le nom d'acide hexuronique. D'autre part dans ses premiers travaux sur les processus d'oxydation et de réduction à l'intérieur des cellules animales, cet auteur avait constaté l'existence d'une substance réductrice instable. Il devait plus tard l'identifier avec son acide hexuronique et démontrer avec SVIRBELY qu'il s'agissait de la vitamine C (262). La substance prit désormais le nom d'acide ascorbique.

Elle répond à la constitution suivante :



C'est on le voit une lactone à laquelle le groupement éne-diol confère un pouvoir réducteur intense. Par deshydrogénation on obtient l'acide déhydroascorbique et cette réaction réversible fait de la vitamine C un agent oxydo-réducteur :



La synthèse de l'acide ascorbique peut se faire à partir de la l-xylosone dont on fait le cétonitrile, puis le cétoacide, puis la lactone 1-4 correspondante qui est précisément l'acide ascorbique.

La meilleure synthèse consiste cependant à partir du d-sorbose dont on fait le dérivé diacétonique puis l'acide correspondant qui conduit à l'acide 2-cétogulonique, puis à l'acide l-ascorbique. Ce dernier acide est la lactone de la forme érolique du précédent.

Nous avons dit plus haut que le principe antiscorbutique initial venait d'être scindé en vitamine C proprement dite ou acide ascorbique et vitamine P. SZENT-GYORGYI et ses collaborateurs ont en effet tout dernièrement isolé une flavone agissant spécialement sur la perméabilité vasculaire, à laquelle ils ont donné le nom de vitamine P. C'est tout ce que nous savons à l'heure actuelle sur la dualité du facteur C; elle semble très probable étant données les observations antérieures de SCOTTI-FOGLIENI (248) et de Mme RANDOIN et LECOQ (218).

CHAPITRE V

L'AVITAMINOSE A ET LE MÉTABOLISME DES GLUCIDES DANS LE MUSCLE

Avant d'exposer nos expériences personnelles, nous allons, dans ce chapitre, faire une revue de ce que l'on sait de l'influence de l'avitaminose A sur le métabolisme général. Ces connaissances pourront, en effet, être utiles pour permettre de tirer des conclusions de nos propres recherches.

I. — La carence en facteur A et le métabolisme général

Nous étudierons successivement le métabolisme énergétique, le métabolisme organique et le métabolisme minéral.

MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE. — SIMONNET (254) qui a minutieusement étudié les effets de l'avitaminose A sur l'organisme a observé que le quotient respiratoire restait inchangé. Cependant, il a remarqué que des animaux carencés, soumis à un refroidissement brusque se réchauffent comme les animaux normaux. Mais si on leur impose un refroidissement prolongé, ils succombent tandis que les témoins survivent. Il semble donc que l'avitaminose A entrave la possibilité de renouvellement des réserves énergétiques.

MÉTABOLISME ORGANIQUE. — On est assez peu renseigné sur la nature du trouble apporté au métabolisme organique par la carence en facteur A. Malgré de patientes recherches, les résultats obtenus sont, comme on va voir, assez disparates et il n'y a que ceux de SIMONNET qui soient intéressants.

Cet auteur a montré notamment qu'en période d'arrêt de croissance, le bilan azoté restait positif, que la teneur en créatine et en créatinine de l'urine était normale et que la valeur calorifique des fèces restait inchangée. Comme, d'autre part, DRUMMOND (50) avait montré que la résorption des lipides n'était pas non plus troublée, SIMONNET a pu conclure que la cause initiale des accidents de l'avitaminose A n'était pas un trouble de la résorption.

Par ailleurs, MORGAN et OSBURN (180) ont étudié l'élimination de l'allantoïne : tandis que chez l'animal normal, l'excrétion d'allantoïne diminue au fur et à mesure de la croissance pour augmenter lorsque l'animal perd du poids, on observe au cours de la carence A des variations exactement inverses.

HAMBURGER et COLLAZO (95) ont mesuré la lipémie chez l'enfant après ingestion de beurre consécutive ou non à une absorption d'huile de foie de morue. Ils ont trouvé que l'ingestion préalable d'huile de foie de morue abaissait notablement la lipémie.

Enfin, LIANG et WACKER (150) estiment que la carence en facteur A empêche l'élaboration des lipides aux dépens des glucides et ils constatent en outre que des rats nourris avec un régime pauvre en lipides, en cholestérol et en facteur A contiennent plus de cholestérol que des rats normaux.

MÉTABOLISME MINÉRAL. — D'après GOLDBLATT (93), KORENCHEWSKY et CARR (119), MIYADERE (178), il semble que la teneur du tissu osseux en calcium soit en relation avec la quantité de vitamine A dont l'animal dispose ou dont ses parents ont disposé. La vitamine A régulariserait le métabolisme du calcium à ce point de vue.

Signalons que BETHKE, STEENBOCK et NELSON (19) ont mesuré le taux du phosphore et du calcium dans le sang ainsi que la teneur en cendres des os, en faisant ingérer des proportions variables de calcium, de phosphore et d'huile de foie de morue dans le but de rechercher les rapports optima. Cependant, de telles expériences sont assez illusoire, du moins en ce qui concerne l'étude de l'influence de la vitamine A, par l'huile de foie de morue apporte également la vitamine D.



On voit, en définitive, qu'on ne sait à peu près rien du trouble du métabolisme des glucides au cours de l'avitaminose A. Aucune recherche chimique n'ayant été faite dans le muscle, à notre connaissance sur ce sujet, il nous a paru particulièrement intéressant d'en entreprendre quelques-unes.

II. — Influence de l'avitaminose A sur le métabolisme glucidique du muscle du rat blanc (recherches personnelles)

Comme nous nous proposons de produire l'avitaminose A chez le rat, pour doser les substances glucidiques du muscle, notre premier travail devait consister à choisir avec discernement un régime de base susceptible de réaliser une avitaminose aussi parfaite que possible.

CHOIX DU RÉGIME

De très nombreux régimes ont été proposés, leur énumération serait fastidieuse. Nous nous contenterons d'examiner ceux qui sont le plus couramment employés.

Aux Etats-Unis, OSBORNE et MENDEL (202) ont préconisé une ration de base composée de :

Caséine purifiée	18
Amidon	54
Saindoux.	24
Mélange salin d'OSBORNE et MENDEL (202)	4
Extrait de levure de bière (fraction II selon le technique d'OSBORNE et WAKEMANNJ par jour et par animal.	0,04

DRUMMOND et COWARD (51) proposent le régime suivant :

Caséinogène purifié	18
Amidon de riz purifié	52
Huile végétale (raffinée et hydrogénée)	15

Extrait de levure	5
Jus d'orange	5
Mélange salin	5

tandis que COWARD, KEY, DYER et MORGAN (45) conseillent la préparation suivante :

Caséine purifiée	15
Amidon de riz dextrinisé	73
Levure de bière sèche	7
Mélange salin n° 40 de STEENBOCK	4

Exposer à une lampe en quartz à vapeur de mercure à la distance de deux pieds pendant 30 minutes (2-5 ampères, 130 volts). On remarque ici le souci d'apporter au rat la vitamine D qui lui manque. SHERMANN et STIEBLING ayant signalé que son absence troublait la croissance des animaux.

En France, le professeur JAVILLIER, BAUDE et Mlle LEVY-LAJEUNESSE (109) ont préconisé l'emploi de petits pains cuits au four répondant à la composition suivante :

Caséine (lixiviée à l'alcool et séchée pendant 48 h.)..	15
Huile d'arachide chauffée	15
Fécule de pommes de terre	55
Cellulose	7
Mélange salin de BERTRAND et BENZON	4
Levure de bière sèche	4

Le professeur JAVILLIER a d'ailleurs modifié ensuite légèrement sa formule, utilisant :

Caséine purifiée à l'alcool	17
Huile d'arachide oxydée	2
Saccharose.	10
Fécule.	10
Dextrine.	20
Cellulose.	3
Mélange salin de BERTRAND et BENZON	4
Levure de bière sèche	4

D'autre part, SIMONNET (254) qui, on l'a vu, s'est particulièrement attaché à l'étude du facteur A, employa le régime :

Peptone de muscle	17
Huile d'olive (<i>ad libitum</i>)	0 à 12
Saccharose	76 à 64
Mélange salin d'OSBORNE et MENDEL	4
Levure de bière sèche pulvérisée	3

et Mme RANDOIN et SIMONNET conseillèrent une formule légèrement modifiée :

Peptone de muscle	17
Dextrine.	63,5
Huile d'arachide chauffée à +120° dans un courant d'air.	12
Mélange salin d'OSBORNE et MENDEL	4
Levure de bière sèche	3,5
Papier filtre et eau distillée	à volonté

LECOQ, de son côté, usant d'une autre petite modification, adoptait le régime A5 dont voici la composition :

Peptone de muscle	17
Huile d'olive lavée à l'alcool	12
Saccharose.	64
Mélange salin d'OSBORNE et MENDEL	4
Levure de bière	3

Solution huileuse d'ergostérol irradié au 10.000^e. . X gouttes
SAVARE (246), au cours de son étude sur les vitamines de l'huile d'olive fut amené, dans le laboratoire de LECOQ, à comparer différents types de régimes privés de vitamine A et ses recherches se montrèrent en faveur du régime ci-dessus, comparativement à des régimes plus riches en saccharose ou dans lesquels l'amidon remplaçait le saccharose.

En présence de tous ces faits, il nous a semblé logique de

donner en premier lieu la préférence à des régimes pulvérulents qui, contrairement aux petits pains, par exemple, sont d'une préparation rapide. En second lieu, étant donné les remarques de SHERMANN et STIEBLING, nous avons éliminé les rations qui ne comportaient pas de vitamine D. Enfin, les observations de SAVARE et l'emploi du régime A5 au laboratoire de Saint-Germain, nous ont conduit à l'adopter.

La fabrication de ce régime ne présente en elle-même aucune sorte de difficulté. Nous ne croyons cependant pas inutile de donner ici la formule du mélange salin d'OSBORNE et MENDEL qui entre dans sa composition et dont la préparation demande certaines précautions que nous allons signaler.

Ajoutons que ce mélange qui apporte à l'animal les infinnités petits chimiques minéraux indispensables, se retrouve dans des régimes destinés à réaliser d'autres avitaminoses.

Mélange salin d'OSBORNE et MENDEL :

Carbonate de calcium	134,8
Carbonate de magnésium	24,2
Carbonate de sodium	34,2
Carbonate de potassium	141,2
Acide phosphorique	103,2
Acide chlorhydrique	53,4
Acide sulfurique	9,2
Acide citrique	111,1
Citrate de fer	6,34
Iodure de potassium	0,03
Sulfate de manganèse	0,079
Fluorure de sodium	0,24
Sulfate d'alumine et de potassium	0,0245

On mélangera avec soin les carbonates dans une capsule de grande dimension puis on ajoutera les acides en malaxant le mélange effervescent. Il faut avoir soin d'ajouter chaque acide séparément, et dans l'ordre allant successivement du plus fort

au plus faible, afin de ne pas déplacer avec un acide les sels formés par le précédent. On ajoutera donc les acides sulfurique, chlorhydrique, phosphorique et citrique (ce dernier dissous dans le tiers de son poids d'eau chaude). Entre temps, on aura dissous à part dans un bécher les autres sels dans le minimum d'eau chaude et aussitôt la dernière addition d'acide citrique, avant que la masse ne durcisse, on versera dans la capsule le contenu du bécher. Le mélange sera alors évaporé à l'étuve à 90-100°.

EXPÉRIMENTATION

Au point de vue de l'action sur le métabolisme musculaire, il nous a semblé intéressant de comparer au régime varié naturel, non seulement le régime A5 producteur d'avitaminose A, mais aussi le régime A5 complété par une dose suffisante de vitamine A sous forme d'huile de foie de morue.

A cet effet, nous avons disposé de deux lots d'animaux : le lot I soumis au régime A5 exclusif et le lot II au régime A5 complété par 5 % d'huile de foie de morue. Chaque lot était constitué par huit jeunes rats de 3 à 5 semaines et d'un poids moyen de 40 à 50 gr., ces conditions d'âge et de poids étant signalées par tous les auteurs comme les plus favorables au développement de l'avitaminose A. De plus, nous avons veillé à ce que le régime préexpérimental ne soit pas particulièrement riche en vitamine A.

La possibilité de mise en réserve de ce facteur A, en effet, a été suggérée par OSBORNE et MENDEL (201), puis confirmée par Mc COLLUM et DAVIS (164) et par DRUMMOND et COWARD (51). Cette provision peut même être constituée par l'intermédiaire de la mère au cours de la gestation et de la lactation selon CRAMER DREW et MOTTRAM (46). Aussi les rats utilisés et leur mère ont toujours été nourris avant l'expérience, avec du pain trempé dans du lait, quelques légumes frais (sans carottes) et des comprimés de levure, alimentation suffisamment variée sans richesse marquée en vitamine A.

Pour soumettre les rats à leurs régimes respectifs dans des conditions convenables, nous les avons enfermés séparément dans des cages métalliques grillagées munies d'un double fond permettant l'évacuation des excréments (fig. 8).

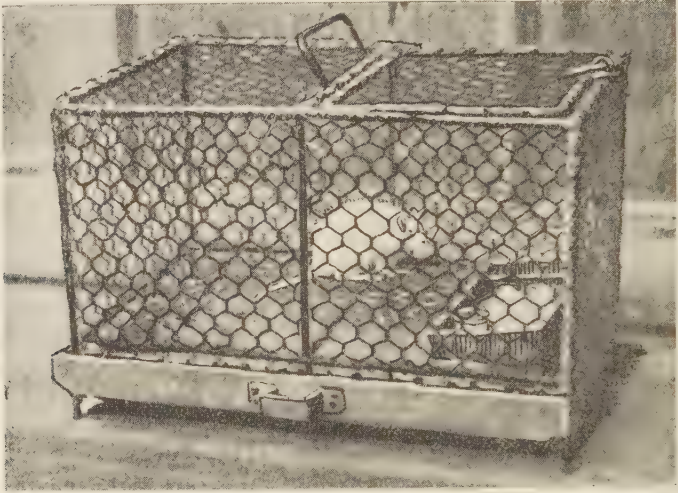


Fig. 8. — Type de cage métallique pour animaux de laboratoire.

Pesés quotidiennement, les animaux recevaient à discrétion leur nourriture distribuée dans des auges placées dans les cages. Eau et papier filtre étaient donnés à part et à volonté.

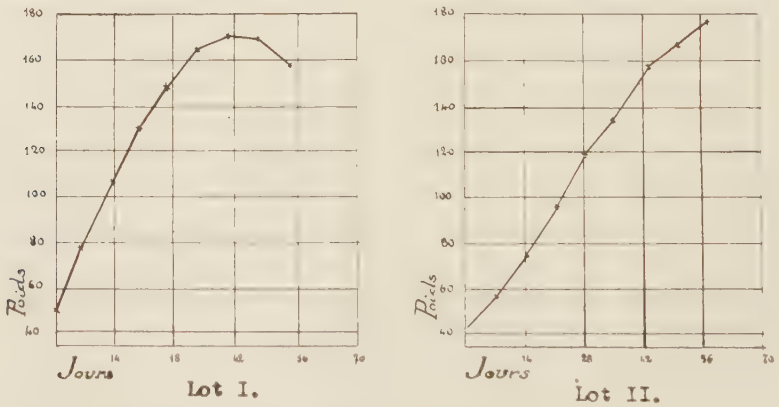


FIG. 9. — Variations moyennes du poids de rats blancs recevant le régime A 5 exclusif (Lot I) et le régime A 5 complété par 5 % d'huile de foie de morue (Lot II).

Au 41° jour, le poids des animaux du lot I atteint sa valeur maxima : 170 gr. Au 55° jour, la chute du poids ayant dépassé 8 % de cette valeur, la xérophthalmie avait fait son apparition chez tous les animaux. Nous les avons sacrifiés ayant jugé le développement de l'avitaminose suffisamment avancé. Pendant ce temps, la courbe des poids moyens des animaux du lot II s'était montrée régulièrement croissante. Nous les avons tués également le 55° jour.

Afin que nos résultats sur le muscle représentent la composition moyenne des 8 animaux constituant un lot, nous avons mélangé les muscles de toutes leurs pattes postérieures pour diviser ensuite le mélange en échantillons destinés à chaque dosage.

Il va sans dire que nous avons dû nous faire aider pour opérer dans les conditions requises de manipulation, c'est-à-dire très rapidement, en tuant les 8 animaux simultanément.

Nos résultats figurent dans le tableau ci-dessous à côté des moyennes relatives au régime varié naturel.

Tableau I

	Régime varié naturel	Régime A5 Lot I	Régime A5 + huile de foie de morue Lot II
Composés réducteurs glucidiques totaux	143,5	138	150
Acide lactique	243	231	232
Orthophosphates	69,5	75,5	62
Acide créatinephosphorique	16,5	16	19
Acide adénylpyrophosphorique	32,5	34	29
Esters facilement hydrolysables..	18	19	19
Phosphore total acidosoluble	191	206	162
Orthophosphates x 100	36,3	36,6	38,2
Phosphore total			
Acide créatinephospho- rique x 100	8,6	7,7	11,7
Phosphore total			
Acide adénylpyro- phosphorique x 100	16,9	16,5	17,9
Phosphore total			
Esters facilement hy- drolysables x 100	9,4	9,2	11,7
Phosphore total			

On peut voir que comparativement au régime varié naturel le régime A5 n'apporte pas de modifications sensibles à la composition glucidique du muscle. Les variations observées sont, en effet, en général inférieures à celles que nous avons pu constater d'un groupe d'animaux normaux à l'autre.

Le régime A5 complété par l'huile de foie de morue semble par contre entraîner une diminution des orthophosphates et du phosphore total acidosoluble. Mais puisqu'il n'y a pas de différences sensibles entre les résultats du régime naturel et du régime A5, il est difficile d'admettre que les variations phosphoriques imputables à l'huile de foie de morue soient dues à l'apport de vitamine A. Il est possible qu'elles soient dues à l'apport supplémentaire de vitamine D. Nous le vérifierons au chapitre suivant.

En somme, il ne semble pas que la carence en facteur A trouble le métabolisme des glucides musculaires, tout au moins dans les conditions où nous avons opéré.

A ce sujet, nous avons pensé que la durée de l'évolution de l'avitaminose était peut-être trop courte pour que le muscle ait eu le temps d'en accuser les effets au point de vue chimique. Aussi il nous a paru intéressant de recommencer une expérience en produisant une avitaminose A moins brutale et par conséquent de plus longue durée.

A cet effet, nous avons disposé d'un nouveau lot (lot III) de 8 jeunes rats âges de 6 semaines, d'un poids moyen de 65 gr., qui avaient été à un régime préexpérimental naturel particulièrement riche en carottes et auquel nous ajoutons de temps à autre de l'huile de foie de morue. De cette façon, nous disposons pour notre expérience, de rats ayant fait des réserves en vitamine A et initialement plus forts que dans les cas précédents. Soumis au régime A5 exclusif, ces animaux furent comme les autres, pesés tous les jours. La courbe moyenne des poids se révéla beaucoup plus ample que dans le cas de l'avitaminose brutale, ce qui nous permit de faire durer l'expérience 90 jours.

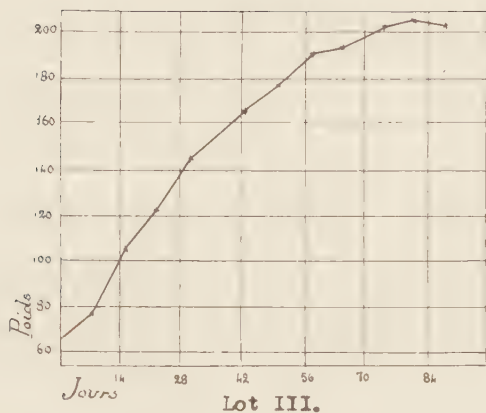


FIG. 10. — Variations moyennes du poids de rats blancs recevant le régime A5 après un régime préexpérimental riche en vitamine A.

Au bout de ce temps, les animaux furent sacrifiés et l'analyse de leurs muscles nous donna les résultats suivants :

	Régime préexpérimental riche en vitamine A et régime A5 Lot III
Composés réducteurs glucidiques totaux	145
Acide lactique	225
Orthophosphates	72
Acide créatinephosphorique	17
Acide adénylpyrophosphorique	30
Esters facilement hydrolysables ..	18
Phosphore total acidesoluble	165
<u>Orthophosphates x 100</u> Phosphore total	43,6
Acide créatinephos- phorique x 100	7,2
Phosphore total	
Acide adénylpyrophos- phorique x 100	18,1
Phosphore total	
Esters facilement hy- drolysables x 100	10,9
Phosphore total	

Dans ces cas, encore, on n'enregistre aucune variation significative.

En présence de tous ces faits, on ne peut donc apporter à ce chapitre qu'une conclusion négative :

L'avitaminose A brutale ou atténuée ne semble entraîner dans le muscle aucun trouble du métabolisme des glucides.

Cette conclusion se trouve en accord avec les données toutes récentes de Mlle EMERIQUE (67) qui fait de l'avitaminose A un facteur d'arrêt dans la synthèse des protides.

CHAPITRE VI

LE RACHITISME EXPERIMENTAL ET LE METABOLISME DES GLUCIDES DANS LE MUSCLE

L'influence du rachitisme expérimental sur le métabolisme général a donné lieu à des observations qui ont surtout porté et pour cause sur le métabolisme du phosphore et du calcium. Quelques auteurs ont étudié plus particulièrement le métabolisme du phosphore dans le muscle. Comme leurs recherches touchent de près les nôtres, nous les exposerons avec quelques détails après avoir passé en revue l'état actuel de nos connaissances concernant les troubles du métabolisme en général.

I. — Le rachitisme expérimental et le métabolisme général

En ce qui concerne le métabolisme minéral, on observe chez le rat rachitique, un abaissement léger de la teneur en phosphore minéral du sang. Cet abaissement se retrouve aussi chez le chien (SHARPE) (251) et chez les volailles (ACKERSON, BLISH et MUSSEHL (5). BLUM, DELAVILLE et van CAULAERT (21) estiment que cette hypophosphatémie est en relation avec la réserve alcaline du sang, l'excès de CO_2 faisant émigrer une partie du phosphore du plasma dans les globules rouges. Sous l'influence d'un traitement à l'huile de foie de morue, le phospho-

re sanguin reprend d'ailleurs sa valeur normale. Sans être la règle, l'hypocalcémie est fréquente au cours du rachitisme, elle a été observée chez les volailles et chez le rat. CAVINS (34) a retrouvé la relation de CRAMER et HOWLAND concernant le produit des concentrations en calcium et en phosphore minéral du sérum. Ces concentrations étant évaluées en milligrammes pour 100 cc., il y a rachitisme si leur produit est inférieur à 30, rachitisme probable entre 30 et 40 et absence de rachitisme ou guérison au-dessus de 40.

Le calcium diminue également dans les tissus : DUTCHER, CREIGHTON et ROTHROCK (57) l'ont observé en particulier dans le tissu osseux où le dosage de calcium peut même servir à déceler l'absence ou la présence d'une substance antirachitique dans un régime. Mc CANN et BARNETT (161), d'autre part, ont constaté que chez le rat rachitique, le calcium et le phosphore total de l'animal entier diminuent. Cette diminution est d'autant plus sensible que la croissance est plus avancée. Elle s'observe, si le régime est déséquilibré, par excès de phosphore par rapport au calcium, et inversement, si le déséquilibre est dû à un excès de calcium par rapport au phosphore. Ces mêmes auteurs ne constatent pas d'ailleurs de différences très nettes dans le tissu osseux.

Plus récemment, Mlle Isabelle GARCIA (90) dosant le phosphore dans les os de jeunes rats blancs soumis au régime rachitigène RANDOIN-LECOQ a trouvé une diminution du phosphore de l'os alors que le phosphore total de l'animal ne varie que très faiblement. Mlle I. GARCIA signale qu'un travail antérieur (89) lui a montré une augmentation du phosphore musculaire chez le rat rachitique, augmentation atteignant 30 %, parfois, de la valeur normale. Elle en conclut qu'au cours du rachitisme, l'animal jeune met en réserve dans ses muscles tout le phosphore ingéré qu'il ne peut plus fixer dans ses os malades. Reprenant les mêmes expériences avec le même régime complété par de l'huile de foie de morue, elle observe chez des animaux en croissance ayant des lésions rachitiques en pleine évolution, la guérison de ces lésions tandis que les taux du phosphore osseux et du phosphore total de l'ani-

mal sont supérieurs à la normale. Elle pense que la vitamine D intervient en favorisant la formation de dépôts salins.

En ce qui concerne le métabolisme organique, LECOQ (129) a montré que le rachitisme expérimental, par suite du déséquilibre phosphocalcique peut, dans une certaine proportion, entraver l'utilisation des glucides.

Soumettant des rats au régime rachitigène RANDOIN-LECOQ dans lequel il faisait varier la nature du glucide, il a montré que l'aptitude à favoriser la croissance du rat s'échelonne pour les hexoses de la façon suivantes :

glucose > lévulose > galactose

et pour les holosides :

maltose > saccharose > lactose

Ayant, par ailleurs, nourri des rats avec un régime artificiel, dont l'équilibre salin était satisfaisant et dans lequel il faisait également varier la nature du glucide, il n'avait noté que des variations peu sensibles dans l'utilisation du lévulose, du glucose, du saccharose et du maltose.

Par contre, le lactose et surtout le galactose étant par leur nature une cause de déséquilibre dans la ration, se montraient toujours mal utilisés.

II. — Le rachitisme expérimental et le phosphore musculaire

COLE et KOCH (40) en 1931, ont déterminé la distribution du phosphore dans les muscles (gastrocnémiens) du rat blanc en fonction du temps : 1° avec un régime varié naturel ; 2° avec le régime rachitigène de Mc COLLUM ; 3° avec le régime de Mc COLLUM complété par l'ergostérol irradié. Ils ont dosé successivement le phosphore total acido-insoluble, acido-soluble, le phosphore inorganique et labile, le phosphore labile et le phosphore total (somme de l'acido-insoluble et de l'acido-soluble).

D'après ces auteurs, le régime rachitigène a pour effet d'abaisser le taux du phosphore total acido-insoluble et acido-soluble. Lorsque ce régime suit immédiatement le sevrage, le

phosphore total musculaire décroît assez rapidement en 50 jours pour croître ensuite vers le taux normal de l'animal adulte. Au contraire, pendant ce temps, il y a chez les animaux au régime naturel, une augmentation du phosphore musculaire suivie d'une diminution vers la normale. La valeur du phosphore acido-soluble est en-dessous de la normale au sevrage, mais elle croît plus rapidement vers cette normale au cours du régime naturel qu'au cours de rachitisme, les valeurs étant les mêmes dans les deux cas au bout de 60 jours. De plus, la somme phosphore labile + phosphore inorganique est, après les 5 semaines qui suivent le sevrage, plus élevée chez les animaux rachitiques que chez les animaux normaux.

Par ailleurs, HENTSCHELL et ZOELLER (99), en 1927, ayant fait un travail analogue sur le muscle de rats normaux et de rats rachitiques au régime de Mc COLLUM, de SHERMAN-PAPPENHEIMER et de STEENBOCK modifié, avaient trouvé en ce qui concerne cette fraction du phosphore musculaire, des résultats exactement inverses. Les chiffres correspondant à la somme phosphore labile + phosphore inorganique étant inférieurs à la normale chez des rats soumis pendant 2 à 8 semaines à ces régimes rachitigènes. Mais les auteurs allemands n'ayant pas publié la composition de leur régime témoin, il est impossible de savoir si la divergence des résultats était due à une différence de composition des régimes témoins ou à une autre cause.

Enfin, COLE et KOCH montrent que des doses quotidiennes d'ergostérol irradié atteignant 2.800 à 20.000 unités ne modifient pas sensiblement les valeurs trouvées dans le rachitisme sauf en ce qui concerne le phosphore acido-insoluble.

Le taux du phosphore acido-insoluble varie assez sensiblement avec l'âge du rat, il a sa valeur la plus élevée au moment du sevrage. Cette valeur décroît rapidement dans tous les groupes d'animaux en expérience atteignant un minimum à 2 mois et demi ou 3 mois, ce minimum étant plus faible chez les animaux rachitiques et encore plus faible chez ceux qui reçoivent de l'ergostérol irradié. Les auteurs en déduisent que l'ergostérol semble hâter la transformation du phosphore musculaire

en phosphore destiné à l'ossification aux dépens du phosphore acido-insoluble du muscle.

NICOLAYSEN, en 1936 (196), a repris la question en l'étendant d'ailleurs au métabolisme général du phosphore. Il n'a plus pris en considération l'âge des animaux, mais s'est efforcé d'établir le taux des principaux composés phosphoriques du muscle du foie et des reins : 1° au cours du rachitisme typique; 2° au cours de sa guérison soit par addition de vitamine D, soit par retour à l'équilibre phosphocalcique, soit par ces deux procédés conjointement ; 3° au cours d'une hypervitaminose survenant après un régime rachitigène complété ou non par une dose thérapeutique de vitamine D. Il a de la sorte divisé ses rats en six lots : le lot I recevant un régime de base rachitigène comportant 76 % de farine de maïs, 20 % de gluten, 3 % de carbonate de chaux, 1 % de chlorure de sodium. Ce régime sans vitamine D donnant un rapport Ca/P égal à 4,7 a été maintenu jusqu'à contrôle radiographique de lésions typiques du rachitisme.

Le lot II a reçu le même régime complété quotidiennement par 50 unités internationales de calciférol.

Le lot III a reçu le régime initial sans vitamines dans lequel 1 % de phosphate bicalcique était substitué aux 3 % de carbonate de chaux de façon à ramener la valeur du rapport Ca/P à 0,7.

Le lot IV a reçu le régime du lot III complété comme le lot II par 50 unités internationales de calciférol.

Enfin, les lots V et VI ont reçu, pour commencer, respectivement les régimes des lots I et II jusqu'à ce que l'examen radiographique décèle les lésions caractéristiques du rachitisme dans le lot V. A ce moment, les rations ont été complétées pendant quelques jours par des doses quotidiennes s'échelonnant entre 50.000 et 100.000 unités internationales de calciférol. Nous nous bornerons à rapporter les résultats intéressant le muscle.

L'auteur trouve une diminution de la somme phosphore inorganique + phosphagène dans le muscle des animaux rachitiques du lot I comparativement à ceux du lot II. Et les chiffres

qu'il trouve pour les lots III, IV, V et VI sont très voisins de ceux du lot II. L'addition de vitamine D au régime rachitigène aurait donc le même effet sur la fraction de phosphore musculaire étudiée que le retour à l'équilibre phosphocalcique; et l'addition de vitamine D à un régime préalablement rééquilibré n'apporterait aucune modification.

L'hypervitaminose D donne les mêmes résultats que l'addition de vitamine D à dose thérapeutique et l'hypervitaminose succédant à un régime complété semble sans effet sur le phosphore musculaire. Enfin, dans toutes les expériences, il n'y a aucune variation appréciable dans le taux des esters facilement ou difficilement hydrolysables.

III. — Influence du rachitisme expérimental et de sa guérison sur le métabolisme glucidique du muscle du rat blanc. (Recherches personnelles.)

CHOIX DU RÉGIME

Parmi les nombreuses formules proposées pour l'étude du rachitisme expérimental, la plus ancienne est celle de SHERMANN et PAPPENHEIMER (253) qui est ainsi composée :

Farine de blé commerciale (taux d'extraction : 70-74 %)	95
Lactate de calcium	2.9
Chlorure de sodium	2
Citrate ferrique	0.1

Le déséquilibre phosphocalcique est produit par une carence manifeste en phosphore dans ce régime, mais la carence en calcium pouvant donner aussi bien des résultats identiques, PAPPENHEIMER, Mc CANN et ZUCKER (207) ont proposé leur régime 85 C ainsi constitué :

Farine de blé commerciale.....	95
Phosphate bipotassique	2,9
Chlorure de sodium	2
Citrate ferrique.	0,1

Ces deux régimes ont le défaut d'être insuffisants, indépendamment du déséquilibre et de la carence qu'ils comportent. C'est pourquoi les auteurs ont proposé par la suite, la formule suivante plus complète, destinée à combler ces insuffisances en ce qui concerne notamment les sels minéraux et la vitamine A (208).

Régime D

Farine de blé commerciale.....	80,9
Albumine d'œuf	10
Graisse de beurre	5
Mélange salin Z 84	4,1

Mélange salin Z 84

Chlorure de potassium	85
Carbonate de sodium	85
Carbonate de magnésium	28,6
Lactate de calcium	200
Citrate ferrique	10
Iodure de potassium.	0,020
Sulfate de manganèse	0,078
Fluorure de sodium	0,240
Alun de potassium calciné	0,024

Avec ce régime, les animaux croissent plus facilement et le rachitisme obtenu est d'autant plus grave.

Le régime 3.143 de Mc COLLUM, SIMMONDS, SHIPPLEY et PARK (167) est également bien connu. Il se compose de :

Blé entier.	33
Maïs entier	33
Gélatine.	15
Gluten de blé	15
Chlorure de sodium.	1
Carbonate de chaux.....	3

Il est d'ailleurs voisin du régime 2.695 de STEENBOCK et BLACK (257) :

Maïs.	76
Gluten.	20
Carbonate de calcium	3
Chlorure de sodium.	1

Ces deux régimes ont malheureusement l'inconvénient de renfermer beaucoup de céréales dont la qualité et l'origine sont souvent variables. C'est ainsi que des insuccès fréquents ont été observés par Mc COLLUM et ses collaborateurs par l'emploi de blés durs trop riches en phosphates, dans le régime 3.143. HOLMES et TRIPP (103) ont de même constaté l'inconstance des résultats obtenus avec le régime 2695, selon l'origine du maïs employé.

Pour obvier à ces inconvénients, Mme RANDOIN et LECOQ (219) ont proposé un régime beaucoup plus synthétique et qui a cependant l'avantage d'être simple à préparer. Ce régime RL se compose de :

Peptone de muscle	17
Levure de bière sèche pulvérisée	3
Graisse de beurre	5
Huile d'olive	5
Saccharose.	65
Mélange salin Z 84.	4
Lactate de chaux	1
Papier filtre donné à volonté.	

Au point de vue minéral, ce régime est davantage basé sur un déséquilibre phosphocalcique que sur une carence véritable en phosphore. Il renferme, en effet, 0,120 à 0,187 de phosphore et 0,429 à 0,466 de calcium, variant légèrement avec la peptone, la levure et les matières grasses utilisées.

Le rapport Ca/P oscille entre 2,5 et 3,75 sans action sensible sur les résultats obtenus.

Son action rachitigène est remarquable par sa rapidité.

Alors qu'avec le régime D de PAPPENHEIMER, Mc CANN et ZUCKER, par exemple, il faut 20 jours pour que de jeunes rats présentent des lésions osseuses caractéristiques, des résultats analogues peuvent être obtenus en six à huit jours avec le régime RL.

C'est pourquoi, nous n'avons pas hésité à choisir un régime aussi pratique, aussi efficace et qui d'ailleurs, depuis qu'il existe, a été utilisé avec succès par bien des chercheurs.

EXPÉRIMENTATION

Dans une première partie d'expériences nous avons étudié uniquement l'effet du régime rachitigène sur le muscle (55). Pour produire convenablement le rachitisme expérimental dans le délai de 6 à 8 jours avec le régime RL, il est nécessaire d'observer certaines précautions. L'âge des animaux est d'une extrême importance, trop jeunes ils meurent rapidement sans avoir eu le temps de présenter des lésions rachitiques; trop âgés, ils demandent au contraire une expérience plus longue qui n'est pas toujours concluante.

Pour opérer dans des conditions optima, il faut prendre de jeunes rats de 35 à 45 grammes, au sortir du sevrage, c'est-à-dire exactement âgés de 21 jours, ce que nous avons fait.

Le régime préexpérimental donné aux mères ne doit pas, d'après HESS, WEINSTOCK et TOLSTOI (101) être trop riche en vitamine D. Aussi, nous avons employé celui de nos premières expériences relatives à l'avitaminose A qui ne nous a pas paru présenter cet inconvénient.

Nous avons alors constitué pour commencer, trois lots de 10 rats dans le but de faire une série de déterminations avec chaque lot. Quelques essais préalables nous avaient montré, en effet, que si cinq rats adultes suffisent, il faut un minimum de 10 jeunes rats pour avoir des prélèvements en quantité suffisante.

Comme, d'après COLE et KOCH le muscle du jeune rat n'a pas la même composition que celui de l'adulte à l'état normal, nous avons jugé indispensable de refaire notre série de dosa-

ges avec les animaux du premier lot qui ont été simplement maintenus à une alimentation variée naturelle pendant dix-sept jours.

Les animaux des lots II et III étaient par contre, enfermés individuellement à l'obscurité, dans des cages à expériences (déjà décrites à propos de l'avitaminose A) et soumis au régime RANDOIN-LECOQ exclusif pendant dix-sept jours. Au septième et au dix-septième jour, leurs lésions osseuses ont été examinées par radiographie.

Nous devons à l'amabilité de M. CONTREMOULINS de nous avoir initié à la technique très spéciale de radiographie de



FIG. 11. — La radiographie d'un rat à l'Hôpital de St-Germain

rats. Voici d'ailleurs quelques précisions concernant l'installation dont nous disposons et qui a subi quelques modifications d'appareillage depuis la description qu'en a faite VILLUIS (270) en 1932.

On place sur la table d'examen, juste au-dessous de l'ampoule, la pellicule radiographique dans son enveloppe de papier. Le rat est posé dessus, sur le ventre et, comme on peut le voir sur la photographie ci-contre, il est simplement maintenu par des ficelles attachées à chaque patte. On utilise généralement une pellicule de format 24×30 , ce qui permet de radiographier trois animaux sur la même, grâce à un jeu de caches en plomb. L'ampoule qui est une Coolidge type R 6/1 et qui fonctionne sous une tension de 50 kilovolts, est à une distance de 75 cm. du sujet à examiner.

Avec un film Osray (Gevaert) sans écran, on obtient avec 20 milliampères-seconde d'excellents résultats. Pour avoir un instantané suffisant, on fait généralement passer dans l'ampoule un courant de 50 milliampères-seconde et on pose $2/5^{\circ}$ de seconde. Au septième jour, chez tous les animaux, des lésions osseuses furent notées. Avec plus ou moins de netteté, on distinguait toujours l'élargissement de la zone non calcifiée diaphyso-épiphysaire spécialement à la tête du tibia et de l'humérus. Au dix-septième jour, ces lésions étaient encore plus caractéristiques ainsi qu'on peut le constater sur les radiographies ci-après.

Tous les animaux ont alors été sacrifiés. Comme il eût été trop long, même avec des aides, de tuer les animaux d'un lot, de couper les 20 pattes postérieures, de prélever et mélanger les muscles, nous avons dû procéder en deux étapes. Cinq animaux furent d'abord tués, nous donnant le prélèvement destiné au dosage de l'acide lactique. Celui-ci une fois fixé, les cinq autres animaux tués à leur tour nous donnèrent, après mélange de leurs muscles, matière à prélèvement pour les dosages de glucides totaux et de composés phosphoriques. C'est donc finalement la moyenne de cinq animaux que représente chaque série de dosages.

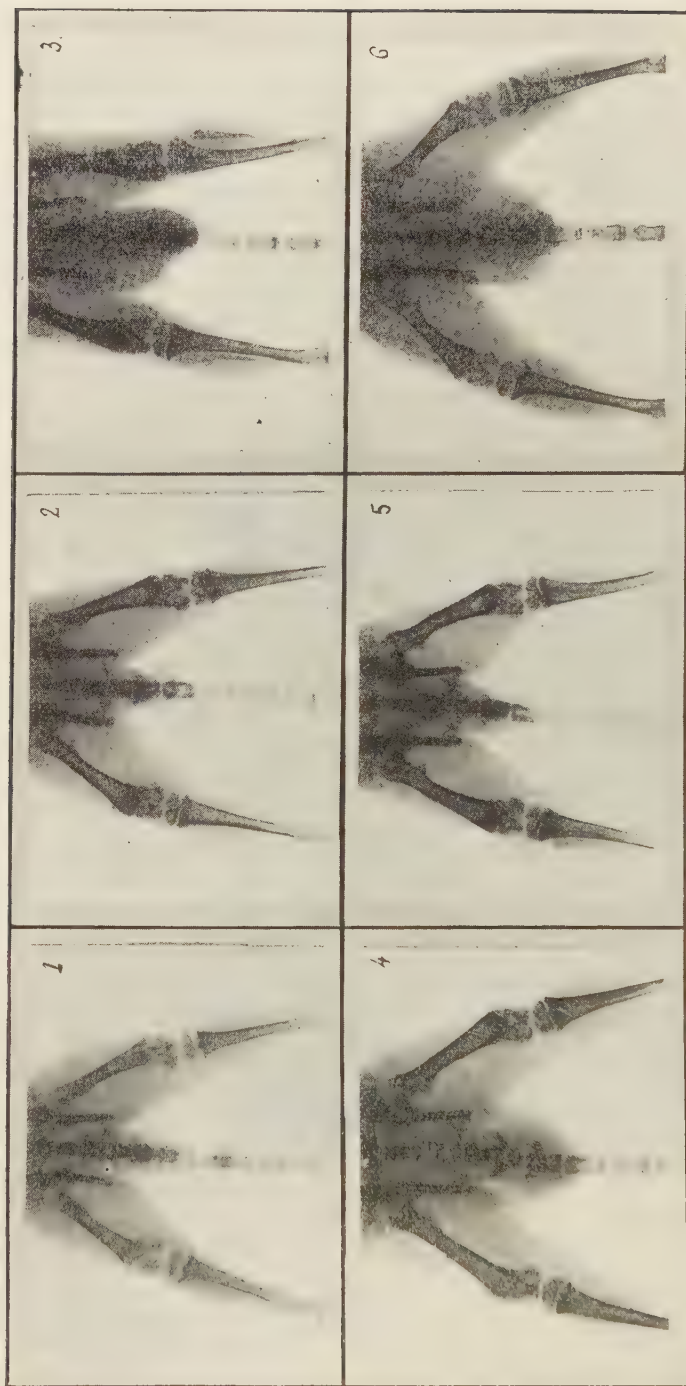


FIG. 12. — Radiographies des pattes postérieures de jeunes rats.

(1) après 7 jours du régime rachitigène R L.

(2) après 7 jours du régime rachitigène R L + 10 jours de traitement par l'ergostérol irradié.

(3) après 7 jours du régime rachitigène R L + 10 jours de traitement par l'huile de foie de morue.

(4) après 7 jours du régime rachitigène R L + 10 jours de traitement par l'acide phosphorique.

(5) après 7 jours du régime rachitigène R L + 10 jours de traitement par le β glycérophosphate de sodium.

(6) après 17 jours du régime rachitigène R L.

Tableau I
Jeunes rats.

	Régime nor- mal varié	Régime rachitigène R. L.		Moyenne des lots II et III
	lot I	Lot II	Lot III	
Composés réducteurs glucidiques totaux	184	174	176	175
Acide lactique	158	129	131	130
Orthophosphates	71	80	76	78
Acide créatinephosphorique	14	14	15	14,5
Acide adénylpyrophosphorique	29	30	26	28
Esters facilement hydrolysables	17	17	15	16
Phosphore total acidosoluble	189	183	173	178
Orthophosphates $\times 100$	37,5	43,7	43,9	43,8
Phosphore total				
Acide créatinephos- phorique $\times 100$	7,4	7,6	8,6	8,1
Phosphore total				
Acide adénylpyrophos- phorique $\times 100$	15,3	16,3	15	15,6
Phosphore total				
Esters facilement hy- drolysables $\times 100$	8,9	9,2	8,6	8,9
Phosphore total				

En comparant les résultats de la première et de la dernière colonne de ce tableau, on n'observe pas dans le cas du rachitisme, de variation nette des composés réducteurs glucidiques totaux car la diminution constatée n'atteignant que 4 % de la valeur normale ne peut être retenue. L'acide lactique, par contre, baisse en moyenne de 17 %, ce qui n'est pas encore énorme.

En ce qui concerne le phosphore, on trouve une augmentation de 10 % des orthophosphates alors que les composés labiles et le phosphore total n'accusent pas de variation parallèle. Ils ont, au contraire, tendance à baisser.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons alors étudié l'effet des principaux facteurs de guérison du rachitisme

sur la composition du muscle (55). Deux moyens, comme on sait, étaient à notre disposition : soit l'apport de vitamine D, soit le retour à l'équilibre phosphocalcique par addition de phosphore actif.

Nous avons choisi successivement ces deux moyens en faisant varier les sources de vitamine D et de phosphore actif.

A cet effet, nous avons constitué quatre nouveaux lots de 10 jeunes rats, les lots IV, V, VI, VII, que nous avons soumis au régime RL exclusif pendant 7 jours. Au septième jour, les lésions osseuses ont été contrôlées pour chaque rat par l'examen radiographique, puis le régime a été complété différemment pour chaque lot pendant dix jours. Au bout de ce temps, après nouvel examen radiographique individuel contrôlant la guérison, les animaux ont été sacrifiés.

Le régime du lot IV a été complété par 2 % d'huile de foie de morue, dose suffisante, comme nous avons pu le constater, pour assurer la guérison des lésions.

Le régime du lot V a été complété par 1.000 unités internationales pour 100 de vitamine D. Cette addition a été faite en incorporant au régime 1 % de la solution standard d'ergostérol irradié dans l'huile d'olive, distribuée par la S. D. N., solution dont 1 mmgr. correspond à 1 unité internationale de vitamine D. Cette dose est bien supérieure à la dose utile, puisque LECOQ et VILLETTE (138) (269) estiment celle-ci à 20 unités internationales pour cent. Mais comme nous réalisons déjà la guérison à l'aide d'une dose thérapeutique de vitamine D avec l'huile de foie de morue, nous avons voulu voir, par comparaison, l'effet sur le muscle de l'hypervitaminose.

Le régime du lot VI a été complété par 2 % d'acide phosphorique officinal, soit 1 % de PO_4H_3 , soit 0,316 % de P, dose plus que suffisante pour assurer la guérison puisque d'après LECOQ et VILLUIS (140) l'acide phosphorique agit sur la calcification osseuse à la dose de 0,08 P % de la ration.

Enfin, le régime du lot VII a été complété par 2 % de β -glycérophosphate de sodium cristallisé. Contrairement à I. GARCIA qui prétend que la guérison spontanée du rachitisme peut être entravée par addition au régime R. L. d'une substance

acidogène telle que le glycérophosphate de sodium, LECOQ et VILLUIS (141) (270) ont montré l'action recalciifiante de ce sel. Ces auteurs ont même précisé que tous les glycérophosphates ont un effet analogue, les α et β -glycérophosphates se montrant d'action pratiquement égale, toutefois pour une même dose de phosphore introduite, les glycérophosphates de calcium et de magnésium se montrant moins actifs que le glycérophosphate de sodium. Ce dernier, d'après VILLUIS, a une activité voisine de celle du phosphate disodique. Il produit une calcification nette avec 0,100 P % de la ration. Or, le β -glycérophosphate de sodium cristallisé contient 10,13 % de P. La dose utile de ce sel est donc d'environ 1 %. Peu après, d'ailleurs, LECOQ et Mlle BARBAN (133) serrant de plus près la question, distinguant une très légère différence d'activité entre les α et β -glycérophosphates ont confirmé ce pourcentage et il va sans dire que le fait de le doubler nous a donné des calcifications remarquables comme l'atteste la radiographie n° 5 de la fig. 11.

Nos résultats concernant l'action de la vitamine D et du phosphore actif sont consignés dans les tableaux II et III.

Résultats du tableau II :

Si nous comparons ces nouveaux résultats aux précédents, nous voyons que la très légère diminution du bloc glucidique observée au cours du rachitisme, a tendance à s'accuser sous l'influence du traitement à l'huile de foie de morue, alors qu'une dose plus massive de vitamine D rétablit au contraire une valeur voisine de la normale. L'acide lactique obéirait, par contre, à des variations inverses, mais toujours peu importantes.

Les orthophosphates qui augmentaient avec le rachitisme, diminuent pour revenir à leur taux normal avec sa guérison par l'huile de foie de morue, leur abaissement est encore plus accusé sous l'influence de l'ergostérol irradié.

Le phosphore total avait diminué au cours du rachitisme, l'huile de foie de morue lui rend sa valeur normale alors que l'ergostérol irradié accuse encore sa chute. Les composés labi-

les à part l'acide créatinephosphorique qui augmente un peu sous l'effet de l'huile de foie de morue, ne varient pas de façon appréciable.

Tableau II

	Régime rachitigène P.L. complété par	
	huile de foie de morue Lot IV	Ergostérol irradié Lot V
Composés réducteurs glucidiques totaux	170	180
Acide lactique	151	131
Orthophosphates	72	69
Acide créatinephosphorique	19	14
Acide adénylpyrophosphorique	28	29
Esters facilement hydrolysables	15	14
Phosphore total acidosoluble	189	150
Orthophosphates x 100	38,6	46
Phosphore total		
Acide créatinephosphorique x 100	10	9,3
Phosphore total		
Acide adénylpyrophosphorique x 100 ...	14,8	19,3
Phosphore total		
Esters facilement hydrolysables x 100	7,9	9,3
Phosphore total		

Résultats du tableau III :

Les composés réducteurs glucidiques, s'ils varient peu par un traitement à l'acide phosphorique sont considérablement augmentés sous l'influence du glycérophosphate de soude.

L'acide lactique varie peu. Les orthophosphates qui augmentaient au cours du rachitisme, voient leur taux s'exagérer con-

Tableau III

	Régime rachitigène R.L. complété par:	
	acide phos- phorique Lot VI	glycérophos- phate de soude Lot VII
Composés réducteurs glucidiques totaux	177	262
Acide lactique	148	166
Orthophosphates	90,9	100
Acide créatinephosphorique	13,1	15
Acide adénylpyrophosphorique	33	25
Esters facilement hydrolysables	8	18
Phosphore total acidosoluble	177	212
Orthophosphates x 100	51,3	47,1
Phosphore total		
Acide créatinephosphorique x 100	7,4	7
Phosphore total		
Acide adénylpyro- phosphorique x 100	18,6	11,7
Phosphore total		
Esters facilement hydro- lysables x 100	4,5	8,4
Phosphore total		

sidérablement sous l'influence de l'acide phosphorique tandis que les esters facilement hydrolysables subissent une diminution sensible et que le phosphore total ne varie pas. Sous l'influence du glycérophosphate de soude, les orthophosphates augmentent encore plus sensiblement et tandis que les composés labiles varient peu, le phosphore total augmente.

Que conclure de toutes ces variations ?

1) Il est manifeste que le rachitisme expérimental obtenu avec le régime R. L., provoque dans le muscle du rat blanc un trouble accusé du métabolisme du phosphore. Ce trouble sem-

ble se traduire par une diminution des composés labiles que nous avons dosés et aussi sans doute des esters difficilement hydrolysables au profit des orthophosphates.

Le bilan constaté correspond, en effet, à une diminution légère du phosphore total et des composés labiles dosés alors que les orthophosphates augmentent.

2) Avec l'huile de foie de morue, nous assistons à une diminution des orthophosphates alors que le phosphore total reprend un taux normal. Etant donné que Mlle I. GARCIA (90) trouve régulièrement une augmentation du phosphore total de l'os quand le régime R. L. est complété par l'huile de foie de morue, nous pouvons supposer que la vitamine D a pour effet de favoriser un départ des orthophosphates musculaires vers les os, le taux du phosphore total acidosoluble étant maintenu dans le muscle sans doute par un apport de phosphore organique.

3) Avec une dose plus massive de vitamine D, notre hypothèse se confirme, non seulement nous assistons à un départ des orthophosphates encore plus marqué, mais le phosphore total acidosoluble du muscle diminue. Il est probable que dans ce cas, l'apport de phosphore organique au muscle n'a pas le temps de se faire.

4) La guérison par l'acide phosphorique se traduit par une imprégnation phosphorique du muscle particulièrement nette, le rapport des orthophosphates au phosphore total est caractéristique à ce point de vue.

5) La guérison par le β -glycérophosphate de soude produit les mêmes effets d'imprégnation, mais celle-ci semble à la fois glycérique et phosphorique car, en même temps qu'une augmentation des orthophosphates, on enregistre une augmentation du bloc réducteur glucidique qui paraît provenir de dérivés d'oxydation de la glycérine.

6) C'est le trouble du métabolisme du phosphore qui semble en général, conditionner le trouble du métabolisme des glucides musculaires au cours du rachitisme et de sa guérison.

CHAPITRE VII

L'AVITAMINOSE C ET LE METABOLISME DES GLUCIDES DANS LE MUSCLE

Suivant un plan analogue à celui des chapitres précédents, nous exposerons pour commencer, les principaux travaux relatifs à l'influence de l'avitaminose C sur le métabolisme général.

I. — La carence en facteur C et le métabolisme général

L'étude de l'influence de l'avitaminose C sur le métabolisme, entreprise par de nombreux auteurs, a été amplifiée depuis 1925, par les belles recherches de MOURIQUAND et LEULIER, puis de Mme RANDOIN et Mlle MICHAUX. Insistant particulièrement sur les travaux de ces auteurs, nous étudierons successivement le métabolisme de l'eau, le pH sanguin, la réserve alcaline et le métabolisme des principales substances minérales et organiques.

a) MÉTABOLISME DE L'EAU. — Mlle MICHAUX (176) a étudié l'influence du scorbut expérimental, réalisé chez le cobaye au moyen du régime de Mme RANDOIN et LOPEZ-LOMBA, sur les teneurs en eau des surrénales, du foie, des reins, des poumons, de la thyroïde, des testicules et du sang. Elle a montré que sauf pour la rate où le pourcentage en eau s'élève très légèrement à la fin de la maladie, les teneurs en eau déterminées

dans les autres viscères étudiés sont normales. Dans le sang, par contre, la teneur en eau subit à partir du 21^e jour de régime, une élévation notable jusqu'à la mort de l'animal.

Par ailleurs, MOURIQUAND et LEULIER (185), étudiant dans des conditions analogues, le rapport de l'hydrémie au poids de cendres du sang, avaient conclu que l'avitaminose C ne semble pas entraîner de variations constantes dans un sens déterminé en ce qui concerne les proportions des substances dissoutes dans le plasma sanguin.

b) RÉSERVE ALCALINE ET pH SANGUIN. — D'après FUNK (85), Mc CLENDON, COLE, ENGSTRAND et MIDDLEKAUFF (162), il n'y a pas d'acidose chez le cobaye scorbutique. LEPPER et ZILVA (144) concluent au contraire à une diminution de la réserve alcaline, mais d'après des moyennes concernant différents stades de l'avitaminose C. De plus, leurs animaux-témoins donnent des chiffres qui varient dans des limites vraiment trop larges. MOURIQUAND, LEULIER et SEDALLIAN (189) observent, eux aussi, une diminution irrégulière de la réserve alcaline atteignant au quarantième jour de régime le tiers de sa valeur normale. La mesure du pH sanguin ne leur permet pas de formuler de conclusion, le pH gardant sa valeur normale même au 32^e jour de carence. Il n'y a que chez un animal en imminence de mort qu'ils ont par exception observé un abaissement de sa valeur.

Récemment, Mme RANDOIN, Mlle RAFFY et AGUIRREZABALA (233) ont repris l'étude de la réserve alcaline chez les cobayes normaux et scorbutiques. Ces auteurs insistant sur les variations observées chez les animaux-témoins dans les expériences de LEPPER et ZILVA, se sont efforcés de ne prélever, dans le cœur du cobaye, que le sang artériel pour y effectuer leurs déterminations. De cette façon, ils ont obtenu des résultats très cohérents chez les animaux normaux, et ces données de base leur ont permis d'établir à l'inverse de LEPPER et ZILVA et de MOURIQUAND, LEULIER et SEDALLIAN, que la réserve alcaline augmente très rapidement au cours du scorbut et qu'elle double presque la valeur normale peu de temps avant la mort de l'animal.

c) MÉTABOLISME ORGANIQUE. — Au point de vue du métabolisme protidique, l'animal se comporte au cours du scorbut comme si, devenu incapable d'utiliser les protides de sa ration, il s'attaquait à ses propres protides. On voit, en effet, l'azote total urinaire normal au début, s'abaisser légèrement puis remonter tandis que le poids de l'animal diminue. (CARIDROIT [33], SCHEPILEWSKAYA et JARUSSAVA [249]).

PALLADIN et KUDRIAZEWA (203) ont montré que l'excrétion de la créatine augmentait dans le scorbut, et LEWIS et KARR (148) ont trouvé que le taux de l'urée sanguine croissait jusqu'à atteindre cinq fois sa valeur normale chez le cobaye nourri avec de l'avoine.

Mme RANDOIN et Mlle MICHAUX (227) ont repris cette étude de l'urémie chez le cobaye nourri au régime scorbutigène RANDOIN-LOPEZ-LOMBA, comparativement à d'autres cobayes nourris au même régime artificiel complété, ou recevant une alimentation naturelle. Dans ces deux derniers cas, le taux de l'urée sanguine est sensiblement le même. Par contre, au cours du scorbut, la teneur en urée d'abord normale, commence à augmenter vers le douzième jour de régime pour atteindre plus du double de sa valeur du seizième au vingt-deuxième jour. Elle semble diminuer ensuite très légèrement en se maintenant cependant à un taux bien supérieur à la normale (environ le double).

D'après Mlle MICHAUX qui a dosé également l'urée urinaire dans ces conditions, l'augmentation de l'urée dans le sang est due à une insuffisance de son excrétion.

D'autre part, la teneur du sérum en albumines totales n'est sensiblement pas modifiée, mais l'albuminurie s'installe au vingtième jour indiquant l'existence d'une lésion rénale.

En ce qui concerne le métabolisme lipidique, MOURIQUAND et LEULIER (183) (184) ont étudié l'influence du scorbut sur le taux du cholestérol dans le sang, puis dans la rate, les poumons, le foie, les surrénales. Ils n'ont observé aucun changement notable dans le sang ni dans la rate ni dans les poumons ni dans le foie. Par contre, le dosage du cholestérol dans les surrénales a donné des chiffres très inférieurs à la normale.

Dans des recherches analogues, Mme RANDOIN et Mlle MICHAX (230) (231) ont trouvé des résultats concordants. Elles y ont ajouté l'étude du taux des acides gras qui, au cours du scorbut subissent une légère augmentation dans le foie, s'abaissant un peu dans la rate à la période prémortelle et restent stables dans les reins.

Enfin, le métabolisme général des glucides a été étudié par MOURIQUAND, LEULIER et MICHEL (188) et confirmé par Mme RANDOIN et Mlle MICHAX (228) (176), les auteurs lyonnais s'attachant à la mesure de la glycémie, les autres y adjoignant le dosage du sucre protéidique sanguin, et du glycogène dans le foie et dans le muscle, ce qui nous intéresse particulièrement.

Il résulte de ces travaux que le sucre libre ou protéidique du sang ne varie pas beaucoup au cours du scorbut tandis que le glycogène hépatique diminue notablement et qu'on observe aussi une baisse du glycogène musculaire.

Notons en passant, que Mlle MICHAX a fait ses dosages de glycogène par la technique de BIERRY et GRUZEWSKA qui consiste à solubiliser l'organe dans la potasse à 35 %, et à porter à l'autoclave à 120° pendant trente minutes. La liqueur est ensuite refroidie, neutralisée et autoclavée à nouveau. Puis, après défécation mercurielle, le glucose est dosé par la méthode de G. BERTRAND, technique toute différente, on le voit, de celle qui nous conduit personnellement à évaluer non pas seulement le glycogène, mais les composés réducteurs glucidiques totaux.

A part les recherches de Mlle MICHAX, aucun travail intéressant spécialement le métabolisme musculaire au cours du scorbut expérimental n'a, à notre connaissance, été tenté avant le nôtre.

d) MÉTABOLISME MINÉRAL. — Au cours du scorbut, HOWARD et INGVALDSEN (106) n'ont pas trouvé de modification du métabolisme minéral chez le singe, alors que BAUMAN et HOWARD (16) ont observé chez le cobaye, une diminution de l'élimina-

tion du phosphore et du potassium tandis que celle du calcium et du magnésium augmentait.

PALLADIN et SSAWRON (205) étudiant plus particulièrement la calcémie, n'ont pas observé de variations. Par contre, selon ABRAHAM (4), le scorbut provoque une chute du calcium sanguin.

MOURIQUAND, LEULIER et MICHEL (187) ont dosé le phosphore et la chaux des os de cobayes scorbutiques. Les résultats comparés avec ceux des cobayes normaux ont montré que le scorbut n'entraînait ni décalcification, ni déphosphorisation du tissu osseux, qu'il s'agisse de fémurs, de mâchoires ou de dents.

Mme RANDOIN et Mlle MICHAUX (232) se sont attachées à la mesure de la calcémie. Elles ont conclu que les teneurs du plasma en calcium ne variaient pas au cours du scorbut expérimental et qu'elles étaient comparables aux valeurs trouvées chez des cobayes soumis soit au régime naturel, soit au régime artificiel complet.

Le trouble le plus important à notre avis, du métabolisme minéral au cours du scorbut, est celui du fer sanguin qui a été mis en évidence par MOURIQUAND, LEULIER et MICHEL (186).

Jusqu'au 24^e jour de régime scorbutigène, ils constatent que le taux du fer reste à peu près constant. Au-delà du 24^e jour, le taux du fer s'abaisse nettement et si on cesse d'imposer un régime scorbutigène, ce taux reprend sa valeur normale.

Si on compare les résultats des dosages avec ceux de l'hématologie, on voit qu'il y a parallélisme. Aussi, les auteurs concluent que, par la privation de vitamine C, le milieu intérieur semble atteint dans une de ses fonctions de nutrition les plus importantes : l'oxygénation des tissus.

Mme RANDOIN et Mlle MICHAUX (229) ont confirmé ces résultats en montrant que le fer diminue chez les cobayes atteints de scorbut, non seulement dans le sang, mais aussi dans le foie où cette baisse est considérable au fur et à mesure de l'évolution de la maladie. Par contre, dans les mêmes conditions, le fer augmente dans la rate qui est hypertrophiée.

II. — La carence en facteur C et le métabolisme des glucides dans le muscle du cobaye. (Recherches personnelles.)

CHOIX D'UN RÉGIME

Depuis l'expérience initiale de SMITH, un grand nombre de régimes scorbutigènes à base de céréales ont été proposés, la plupart à base d'avoine, d'orge, de maïs et quelquefois de son ou de foin [MOURIQUAND et MICHEL (190), FUNK (85)]. Ils peuvent être complétés par du lait autoclavé, comme le préconisent CHICK, HUME et SKELTON (37) et par divers autres adjuvants laxatifs, lactose, phosphate tricalcique, viande de bœuf, etc.

Ces régimes ont l'avantage d'être en général, parfaitement carencés en vitamine C. Cependant, il est un reproche qu'on peut leur faire, c'est d'être constitués avec des substances naturelles trop complexes pour permettre un bon équilibre nutritif. Il est donc à craindre que leur ingestion chez le cobaye provoque à la longue, un scorbut plus ou moins compliqué de déséquilibre alimentaire. C'est pourquoi, divers auteurs se sont efforcés d'établir des formules de plus en plus rationnelles en utilisant des substances de plus en plus simples.

Déjà, en 1918, COHEN et MENDEL (39) proposaient le mélange suivant :

Farine de soja autoclavée à 120°.....	100 gr.
Lactate de calcium.	3 gr.
Chlorure de sodium.	3 gr.
Levure de bière sèche.	3 gr.
Lait frais.	125 cc.

Le mélange trituré avec soin, étant ensuite séché à l'étuve à 70-80°.

Comme l'emploi du lait frais n'était pas toujours prati-

que, PARSONS (211) le remplaça par de la poudre de lait, de la graisse de beurre et du papier filtre, la formule devenant :

Poudre de lait écrémé.	8
Farine de soja autoclavée à 120°.	76
Lactate de calcium.	3
Chlorure de sodium.	3
Levure de bière.	3
Graisse de beurre.	5
Papier filtre.	2

Puis il fut conduit, en 1920, à supprimer complètement la poudre de lait en la remplaçant par un poids égal de farine de soja, sa formule définitive étant :

Farine de soja autoclavée.	84
Lactate de calcium.	3
Chlorure de sodium.	3
Levure de bière.	3
Graisse de beurre.	5
Papier filtre.	2

Par ailleurs, LEXIS avait constitué un régime un peu différent :

Caséine purifiée.	40 gr.
Flocons d'avoine autoclavée à 120°	50 gr.
Son de blé.	10 gr.
Lactate de calcium.	1 gr. 5
Chlorure de sodium.	1 gr. 5
Lait cru.	20 cc.
Eau distillée.	20 cc.

Puis, HART, STENBOCK et ELLIS utilisèrent un mélange formé de quatre constituants seulement, par conséquent rapide à préparer :

Caséine purifiée.	5
Flocons d'avoine.	69

Farine de luzerne autoclavée à 120°.....	25
Chlorure de sodium.	5

En 1913, Mme RANDOIN et LOPEZ-LOMBA (226) eurent l'heureuse idée de substituer à la farine de soja, la farine de haricots blancs qu'il est plus facile de se procurer en France. Leur régime peu après modifié par Mme RANDOIN, a la composition suivante :

Farine de haricots blancs.	83
Levure de bière granulée.	3
Graisse de beurre.	5,5
Lactate de calcium.	5
Chlorure de sodium.	1,5
Papier filtre.	2

La farine de haricots est cuite une heure avec le papier filtre, le lactate de chaux, le sel et la quantité d'eau suffisante. La graisse de beurre et la levure de bière sont ajoutées après une certaine durée de refroidissement.

Enfin, Mme RANDOIN et LECOQ (223) ont préconisé, en 1929, un régime encore plus synthétique. Sa composition centésimale est la suivante :

Peptone de muscle	17
Levure de bière sèche pulvérisée.	3
Amidon de maïs.	64
Graisse de beurre.	5,5
Chlorure de sodium.	1,5
Lactate de calcium.	5
Mélange salin d'Osborne et Mendel.....	2
Papier filtre.	2,5

La peptone, l'amidon de maïs, les sels et le papier filtre doivent selon les indications des auteurs, être délayés avec 130 à 135 cc. d'eau et cuits à l'ébullition douce en remuant fréquemment jusqu'à évaporation des 30-35 gr. d'eau en ex-

cès. La graisse de beurre et la levure sont ensuite ajoutées dans le mélange tiédi. Le produit terminé contient environ 50 % d'eau. Il se présente sous une forme très épaisse semi-solide.

Ces deux derniers régimes RANDOIN-LOMBA et RANDOIN-LECOQ sont incontestablement mieux équilibrés et mieux définis que tous les précédents. Après les avoir essayés, nous avons donné la préférence au régime RANDOIN-LOMBA qui est d'un prix de revient moins élevé que le second.

Nous croyons utile de signaler ici, quelques précautions à observer lors de la préparation de ce régime.

Il est absolument indispensable durant l'heure de cuisson de remuer constamment le mélange pour ne pas s'exposer à le laisser « attacher » au fond du récipient. Comme les auteurs l'ont indiqué, la graisse de beurre et la levure sont ajoutées après un certain temps de refroidissement. Il est bon de faire cette addition lorsque le mélange a, par exemple, atteint une température voisine de 30°, de cette façon la graisse de beurre s'incorpore facilement. Celle-ci est obtenue préalablement par fusion de beurre frais à 35° qui est décanté et filtré trois fois au papier. Le procédé le plus commode consiste à opérer dans une étuve. Le régime doit être renouvelé tous les jours. Après quelques essais, il sera facile, suivant le nombre d'animaux en expérience, de calculer les doses à préparer quotidiennement pour que ceux-ci aient toujours de la nourriture à discrétion. Si, par exception, on devait faire du régime pour deux jours, il faudrait conserver les rations destinées au lendemain, à la glacière et sans la levure.

EXPÉRIMENTATION

Nos expériences ont consisté essentiellement à étudier chez le cobaye l'influence sur la composition du muscle du régime RANDOIN-LOMBA exclusif, puis du régime RANDOIN-LOMBA complété soit par du jus de citron, soit par de l'acide ascorbique (55 bis).

A cet effet, nous avons disposé de trois lots de 4 cobayes normaux, d'un poids moyen de 690 gr. Tous ces animaux ont

été enfermés individuellement dans des cages métalliques décrites à propos des rats.

Ceux du lot I, comprenant les cobayes n° 1, 2, 3, 4 ont été soumis au régime RANDOIN-LOMBA donné à discrétion.

Ceux du lot II, cobayes n° 5, 6, 7, 8 alimentés de la même façon ont reçu chacun un supplément quotidien de 3 cc. de jus de citron, dose thérapeutique nécessaire et suffisante étant donné leur poids, pour prévenir tout accident scorbutique.

Pour procéder à cette ingestion forcée, il est nécessaire d'opérer très lentement et avec patience. Un seul de nos animaux, en effet, absorba docilement dès le début sa ration, alors que les trois autres se débattaient violemment. Cependant, au bout de quelques jours, ces derniers n'éprouvaient plus la même répulsion et l'opération devint plus facile.

Les cobayes du lot III, comprenant les n°s 9, 10, 11, 12, ont encore subi le régime RANDOIN-LOMBA, mais complété chaque jour, et pour chacun, par un comprimé de vitamine C BYLA de formule :

Acide ascorbique. 0 gr. 05
Excipient q. s. p. 1 comprimé.

Ces comprimés sont présentés par la maison BYLA dans des boîtes métalliques où est réalisé un vide assez poussé. De plus, chaque comprimé est enrobé dans une couche épaisse d'excipient. De cette façon, l'acide ascorbique est à l'abri de l'oxydation.

Nous redoutions celle-ci pour administrer le comprimé à l'animal. Aussi, nous avons tout d'abord pensé le donner rapidement à la pipette. Au sortir de sa boîte, il était rapidement broyé au mortier et mis en suspension dans l'eau, la vitamine hydrosoluble étant bien entendu dissoute dans ces conditions. Mais il fallait bien 5 cc. d'eau pour assurer une suspension convenable susceptible d'être débitée par une pipette et les cobayes éprouvaient une grande répulsion à déglutir ce mélange.

Aussi, par la suite, nous avons procédé avec succès, de la façon suivante : tous les soirs, l'auge contenant le régime RANDOIN-LOMBA était retirée aux cobayes du lot III. Le lende-

main matin, pour chaque animal, nous pulvérisions un comprimé auquel nous incorporions 6 à 7 gr. de régime. Moins d'une heure après, l'animal ayant faim, avait généralement absorbé intégralement cette préparation. Nous lui donnions alors à discrétion jusqu'au soir, du régime scorbutigène.

Tous les cobayes ont été pesés quotidiennement. Nous donnons ci-après leurs courbes de poids. Elles accusent toutes une légère baisse aux premiers jours du régime. Les cobayes mettent, en effet, un certain temps à s'habituer à une nourriture dont la saveur les change considérablement de leur alimentation naturelle. Nous nous devons même de signaler que dans quelques essais préliminaires à ces expériences, nous avons perdu un animal qui a préféré mourir de faim à côté du régime plutôt que d'y toucher. Mais ce n'est là qu'une exception.

Il est à peine besoin de noter que les cobayes des lots II et III n'ont jamais, à aucun moment, présenté les moindres symptômes de scorbut. Leurs courbes de poids se sont élevées dès le cinquième jour et celles des cobayes à l'acide ascorbique marquent une ascension plus nette que celle des cobayes au jus de citron.

Au contraire, les cobayes du lot I, comme il fallait s'y attendre, commencèrent vers le 18^e jour de régime, à se distinguer des autres. A ce moment, nous avons pu remarquer, en les prenant pour les peser, que les articulations des pattes postérieures étaient douloureuses. Puis vers le 20^e jour, ce fut une chute de poids très nette et la diarrhée s'installa. Quelques jours après elle devint sanglante et il fallut surveiller les animaux de très près pour devancer leur mort naturelle, en les sacrifiant cependant le plus tard possible.

Pour ces raisons, étant donné l'allure des courbes de poids, nous avons tué le n° 1 au 27^e jour de régime, le n° 2 au 23^e jour, les n° 4 et 5 au 25^e jour. La moyenne étant de 25 jours, les cobayes des lots II et III furent, par comparaison, sacrifiés au bout de cette durée.

Ainsi que nous l'avons expliqué au chapitre III, il nous a fallu disposer de deux cobayes pour faire une seule série de déterminations sur les muscles des pattes postérieures.

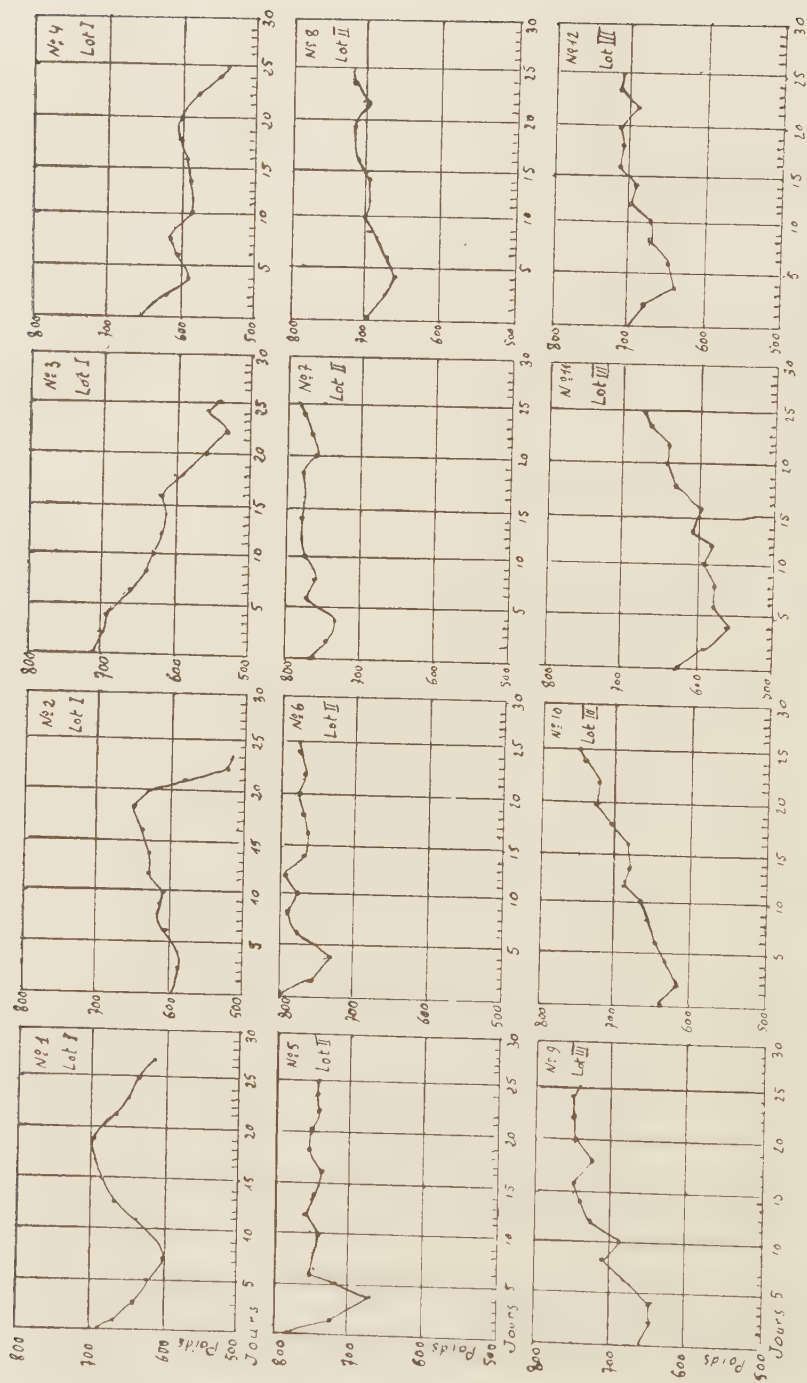


Fig. 13. — Variations du poids de cobayes recevant le régime scorbutigène Randoins-Lomba, complété ou non.

N^{os} 1 - 2 - 3 - 4. Régime scorbutigène exclusif.

N^{os} 5 - 6 - 7 - 8. Régime scorbutigène complété par le jus de citron.

N^{os} 9 - 10 - 11-12. Régime scorbutigène complété par l'acide ascorbique.

A cet effet, nous n'avons pas choisi dans un même lot tel cobaye plutôt qu'un autre pour faire tel dosage. Mais, au contraire, avec une aide, nous avons tué simultanément deux cobayes d'un même lot et, comme avec les rats, nous avons mélangé les muscles découpés de toutes les pattes postérieures pour répartir ensuite le mélange en échantillons destinés à chaque dosage.

Nous présentons ci-après les résultats et leur interprétation.

RÉSULTATS

Les résultats et leurs moyennes ont été groupés pour chaque lot dans un tableau. Nous en avons rapproché, pour les comparer, les moyennes obtenues chez le cobaye normal recevant une alimentation variée naturelle.

Tableau 1

N° des cobayes	Régime 'varié natu-' rel 'moyennes	Régime scorbutigène Lot I		
		1 et 2	3 et 4	Moyennes
Composés réducteurs glucidiques totaux	194	198	194	196
Acide lactique	181	231	200	215
Orthophosphates	72	78	75	76,5
Acide créatinephosphorique	16	16,4	19	17,7
Acide adénylpyrophosphorique ..	34	35,6	31	33,3
Esters facilement hydrolysables	23	20	20	20
Phosphore total acidosoluble ..	182	211	209	210
Orthophosphates x 100	39,5	36,9	35,8	36,3
Phosphore total				
Acide créatinephosphorique x 100	9,9	7,7	9	8,3
Phosphore total				
Acide adénylpyrophos- phorique x 100	19,6	18,6	14,8	15,8
Phosphore total				
Esters facilement hydro- lysables x 100	12,5	9,4	9,5	9,45
Phosphore total				

Par rapport au régime naturel, le régime scorbutigène n'entraîne pas de variations sensibles dans le taux des composés réducteurs glucidiques totaux. L'acide lactique, par contre, est très nettement augmenté et on enregistre également une plus-value des orthophosphates et du phosphore total acidosoluble. Les composés phosphoriques labiles n'accusent pas de différences suffisantes pour être notées et leur rapport au phosphore total reste toujours inférieur à la normale du fait de l'augmentation de ce dernier.

Tableau II

N° des cobayes	Régime scorbutigène complété par du jus de citron Lot II		
	5 et 6	7 et 8	Moyennes
Composés réducteurs glucidiques totaux	294	288	291
Acide lactique	195	183	189
Orthophosphates	80	77	78,5
Acide créatinephosphorique	14	15	14,5
Acide adénylpyrophosphorique	27	30	28,5
Esters facilement hydrolysables	25	20	22,5
Phosphore total acidosoluble	211	215	213
<u>Orthophosphates x 100</u>	<u>37,9</u>	<u>35,8</u>	<u>36,9</u>
Phosphore total			
<u>Acide créatinephosphorique x 100</u> ...	<u>6,6</u>	<u>6,9</u>	<u>6,7</u>
Phosphore total			
<u>Acide adénylpyrophos-</u> <u>phorique x 100</u>	<u>12,7</u>	<u>13,9</u>	<u>13,5</u>
Phosphore total			
<u>Esters facilement hydro-</u> <u>lysables x 100</u>	<u>11,8</u>	<u>9,3</u>	<u>10,5</u>
Phosphore total			

Par rapport au régime naturel, le régime scorbutigène complété par le jus de citron entraîne une augmentation des composés réducteurs glucidiques totaux. Cette augmentation très

nette atteint, en moyenne, la moitié de la valeur normale. L'acide lactique, par contre, ne varie pas sensiblement.

Les différences concernant les composés phosphoriques sont du même ordre que pour le lot I, l'augmentation des orthophosphates et du phosphore total acidosoluble étant même un peu plus accusée.

Tableau III

N° des cobayes	Régime scorbutigène complété par de l'acide ascorbique Lot III		
	9 et 10	11 et 12	Moyennes
Composés réducteurs glucidiques totaux	299	321	310
Acide lactique	176	172	174
Orthophosphates	70	62,8	66,4
Acide créatinephosphorique	19	23,2	21,1
Acide adénylpyrophosphorique ...	32	34	33
Esters facilement hydrolysables	18	16	17
Phosphore total acidosoluble ...	207	200	203,5
Orthophosphates x 100	33,8	31,4	32,6
Phosphore total			
Acide créatinephosphorique x 100	9,1	11,6	10,3
Phosphore total			
Acide adénylpyrophos- phorique x 100	15,4	17	16,2
Phosphore total			
Esters facilement hydro- lysables x 100	8,6	8	8,3
Phosphore total			

Par rapport au régime naturel, le régime scorbutigène complété par l'acide ascorbique entraîne une augmentation importante du bloc glucidique. Cette augmentation atteint en effet près de 60 % de la valeur normale. L'acide lactique, au con-

traire, diminue. Les orthophosphates et les esters facilement hydrolysables ont de même une tendance à tomber au-dessous de la normale. Comme le phosphore total acidosoluble augmente, il s'ensuit une diminution nette des rapports correspondants.

Si nous comparons maintenant entre eux les résultats des trois régimes, nous pouvons faire les constatations suivantes :

1° Le citron, source de vitamine C entraîne, à dose thérapeutique, une augmentation nette des composés réducteurs glucidiques qui s'exagère encore si le régime est complété par une dose quotidienne de 0,05 d'acide ascorbique.

2° L'acide lactique plus élevé qu'à l'ordinaire dans le muscle de cobaye scorbutique, garde sa valeur normale si le régime scorbutigène est complété soit par le jus de citron, soit par l'acide ascorbique.

3° Les orthophosphates et le phosphore total dont le taux est plus élevé qu'à l'état normal sous l'influence d'un régime scorbutigène, ne varient pas sensiblement si ce n'est pour augmenter encore si le régime est complété au jus de citron. S'il est complété à l'acide ascorbique, on observe au contraire, une diminution du phosphore total acidosoluble et surtout des orthophosphates.

4° Les variations des composés labiles sont moins nettes, l'acide ascorbique semble toutefois provoquer une diminution spéciale des esters facilement hydrolysables.

Ces différences marquées entre l'action quotidienne de 3 cc. de jus de citron et de 0,05 d'acide ascorbique, proviennent non seulement de la différence des dosages en acide ascorbique, mais peuvent encore s'expliquer par la dualité de la vitamine C du jus de citron.

Enfin, la comparaison des deux régimes complétés d'une part, avec le régime non complété d'autre part, nous montre incontestablement que la carence en facteur C provoque dans le muscle du cobaye une diminution du taux du bloc glucidique et une augmentation de l'acide lactique. De plus, si le métabolisme interne du phosphore musculaire est troublé sous l'influence d'un régime artificiel complet par rapport au régime

naturel, la carence en facteur C ne semble pas apporter de nouvelle perturbation.

Que faut-il en conclure ? Diminution du bloc glucidique, augmentation de l'acide lactique, métabolisme phosphorique inchangé, voilà qui peut nous permettre de supposer que sous l'influence du scorbut, le muscle respire mal. D'une part, l'acide lactique s'accumule par dégradation anaérobie du glycogène. (Les composés phosphoriques qui interviennent habituellement dans cette dégradation, le font à peu près normalement). D'autre part, l'acide lactique produit arrive difficilement à reformer du glycogène par le seul processus possible, la réaction couplée de PASTEUR-MEYERHOF et il s'ensuit une baisse du bloc glucidique. On voit combien notre hypothèse cadre avec les observations de MOURIQUAND, LEULIER et MICHEL (186) et de Mme RANDOIN et Mlle MICHAUX (229), qui ont trouvé au cours du scorbut, une diminution du fer sanguin en relation avec l'hypoglobulie. C'est vraisemblablement parce que le sang n'apporte plus suffisamment d'oxygène au muscle que celui-ci respire mal.

CHAPITRE VIII

L'AVITAMINOSE B ET LE METABOLISME DES GLUCIDES DANS LE MUSCLE

L'avitaminose B a des effets tellement marqués sur le métabolisme général et sur le métabolisme glucidique en particulier qu'elle a donné lieu dans ce domaine, à des recherches extrêmement poussées. Nous allons en faire une revue aussi succincte que possible avant d'aborder nos expériences.

I. — La carence en facteur B et le métabolisme général

Nous étudierons dans ce paragraphe successivement le métabolisme énergétique, le métabolisme organique et le métabolisme minéral, insistant particulièrement sur les travaux relatifs à la fraction glucidique du métabolisme organique.

MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE

RAMOINO (215), ABDERHALDEN (1), ANDERSON et KULP (8) ont observé une diminution du quotient respiratoire chez les volailles par suppression des vitamines B de leur alimentation naturelle. CARIDROIT (32) ainsi que MAGNE et SIMONNET (160) ont confirmé ces résultats dans des expériences plus précises dans lesquelles ils utilisaient des régimes synthétiques.

Par ailleurs, NICHITA (195) étudiant l'influence de l'avitaminose B sur le métabolisme de base des poules, a trouvé que celui-ci diminuait à la période préagonique.

Récemment, JOLY (111) (112) reprenant systématiquement toutes ces études avec le pigeon sur lequel il réalisait une avitaminose simple au moyen d'un régime synthétique équilibré, riche en glucose, a confirmé la diminution du quotient respiratoire et a montré d'une façon incontestable, que contrairement aux résultats de NICHITA, le métabolisme basal s'exagère.

MÉTABOLISME ORGANIQUE

a) *Glucides*. — Depuis l'expérience initiale d'EIJKMANN (61), il est généralement admis que l'absence de vitamines B d'une ration entrave l'utilisation des glucides. Le rôle quantitatif de la ration glucidique par rapport à la dose de vitamines B présentes, a été mis en évidence par BRADDON et COOPER (25). Ces auteurs alimentant des pigeons avec du riz poli complété par de la levure de bière, ont en effet, montré que plus la quantité de riz est élevée par rapport à la dose de levure, plus les accidents polynévritiques éclatent rapidement.

Mme RANDOIN et SIMONNET, utilisant des régimes artificiels, ont montré que le besoin du pigeon en vitamines B était plus grand pour des régimes à base de glucose que pour des régimes à base d'amidon. La dose nécessaire de vitamines B semblait donc en rapport direct avec le degré d'utilisation digestive des glucides de la ration (234). Ces mêmes auteurs ont alors admis que l'énergie potentielle apportée par les glucides ne peut être utilisée par l'organisme que si le régime apporte en même temps une quantité suffisante de vitamines (235).

Si celles-ci manquent totalement, l'organisme devenant incapable d'utiliser normalement les glucides, il se produirait une inanition partielle aggravée d'une intoxication par les produits dérivés des glucides ou provenant de leur non utilisation (238).

Un peu après Mme RANDOIN et LECOQ, au moyen de onze ré-

gimes artificiels définis, renfermant chacun un seul glucide pur dans la proportion de 66 %, ont précisé que les crises apparaissaient d'autant plus précocement que l'absorption intestinale des glucides était plus rapide et leur aptitude à former du glycogène plus faible (220).

Puis ces mêmes auteurs ont montré d'une façon définitive que le besoin de vitamines B était en rapport avec l'augmentation de la digestibilité des glucides de la ration, en observant que l'addition des ferments amylolytiques de l'orge germée à un régime riche en amidon suffit à accélérer l'évolution de l'avitaminose B expérimentalement provoquée (217).

Par ailleurs, le trouble du métabolisme des glucides au cours de l'avitaminose B a été étudié directement par de nombreux chercheurs. La mesure de la glycémie en particulier a fait l'objet d'un grand nombre de travaux.

Dans la première période de l'avitaminose B, on observe soit de l'hypoglycémie selon COLLAZO (41), PALLADIN et KUDRIAZEWA (204), soit une glycémie normale selon EGGLETON et GROSS (80), FUNK et SCHONBORN (87), Mme RANDOIN et LELESZ (224) (225) et, dans une seconde période, c'est toujours une hyperglycémie que tous les auteurs constatent (COLLAZO (41), FUNK (86), Mme RANDOIN et LELESZ (224) (225), MAGNE et SIMONNET (160), WIERZCHOWSKI (275).

Mme RANDOIN et LELESZ ont d'ailleurs suivi parallèlement les variations du sucre protéidique du sang qui augmente aussi mais plus légèrement que le sucre libre. Ajoutons que EGGLETON et GROSS (60) n'ont pas retrouvé d'hyperglycémie chez le rat, constatant au contraire une faible hypoglycémie dans la période de coma prémortel.

MAGNE et SIMONNET, ainsi que Mme RANDOIN et LELESZ s'accordent pour penser que les réserves de glucides sont encore présentes en quantité suffisante chez les animaux en avitaminose B même en période de crise et ces auteurs estiment que les résultats divergents des autres expérimentateurs (COLLAZO, FUNK, EGGLETON et GROSS) tiennent probablement à ce que ceux-ci utilisent des animaux s'alimentant spontanément

et que l'anorexie conduit à un état plus ou moins marqué d' inanition.

Parallèlement à ces résultats concernant l'hyperglycémie en relation avec l'avitaminose B, NITZESCU et BENETATO (197) ont mis en évidence chez le pigeon carencé, un abaissement net de la tolérance au glucose.

Plus récemment, divers auteurs, KINNERSLEY et PETERS (118), FISCHER (71), THOMPSON et JOHNSON (264) ont trouvé une exagération du taux de l'acide lactique dans les divers tissus (cerveau, muscle, foie, cœur) d'animaux en avitaminose B, constatant également la présence d'acide pyruvique dans le sang de tels animaux.

KAUFFMANN-COSLA et ROCHE (117) par ailleurs, ont constaté au cours de l'avitaminose B, l'élimination d'aldéhyde acétique et d'acide lactique par les urines.

L'an dernier, NITZESCU et GONTZEA (198) ont systématiquement mesuré la lactacidémie chez des poules Rhode-Island red en avitaminose B, en dehors des crises et pendant les crises de polynévrite.

Ils ont trouvé que déjà après 48 heures de régime carencé, quand l'animal ne manifeste aucun trouble et présente un aspect parfaitement normal, on constate une augmentation de la lactacidémie allant de 8 à 12 %. Après une semaine, l'augmentation peut atteindre 80-90 % du taux initial pour atteindre son maximum : 200 %, au stade terminal de l'avitaminose pendant les crises. Chez des témoins recevant le même régime synthétique, mais complété, les variations constatées ne dépassent pas 10 à 12 %. Enfin, chez les animaux carencés, l'administration de levure de bière provoque une diminution du taux élevé de l'acide lactique qui, sous l'influence de ce traitement reprend peu à peu sa valeur normale.

D'autre part, LECOQ a obtenu l'apparition de crises de polynévrite comparables à celles de l'avitaminose B, par simple addition d'acide lactique, à un régime synthétique complet (132).

b) *Protides*. — L'influence de l'avitaminose B sur l'utilisation des protides, après avoir été longtemps discutée, a été précisée d'une façon systématique par LECOQ (124), (125), (127).

Utilisant sur le pigeon de nombreux régimes artificiels (riches ou pauvres en lipides, comportant ou non des glucides, complétés ou non par de la levure de bière) groupés en séries différentes selon la nature de leur fraction protidique, LECOQ est arrivé notamment aux conclusions suivantes : L'absence de glucides dans un régime ne suffit pas à empêcher l'apparition d'accidents polynévritiques, des protides assimilables comme les protides peptonisés ne retardant que fort peu l'évolution de l'avitaminose totale. Cependant, l'adjonction de vitamines B peut assurer une meilleure utilisation de ceux-ci, à condition toutefois que les constituants de la ration réalisent entre eux un équilibre satisfaisant. Le besoin de vitamines B se montre en relation avec la rapidité de l'absorption intestinale des protides et aussi avec leur nature, de sorte que non peptonisés, les protides naturels exercent une action d'épargne sur les vitamines B.

Par ailleurs, le trouble du métabolisme des protides au cours de l'avitaminose B a été étudié directement et plus ou moins indirectement par de nombreux auteurs. Signalons que TSJUN (266) a constaté que le bilan azoté négatif au début, peut devenir positif à la fin et que WIERZCHOWSKI (275) a trouvé des résultats exactement inverses. De nombreux auteurs allemands sont également sur ce point en contradiction, et cela tient à ce qu'ils n'ont pas dans leurs expériences, utilisé de régimes suffisamment définis. Ainsi, HIRABAYASHI (102) déclare que la première période durant laquelle, selon lui, le bilan azoté est positif, correspond à l'avitaminose B tandis qu'à la fin l'animal entre dans une phase scorbutique.

La répartition de l'azote urinaire est également très discutée. DRUMMOND (48), PALLADIN et KUDRIAZEWA (204) ont trouvé de la créaturine, BREAUDAT (26) observant une diminution de l'urée tandis que ADACHI (6), COLLAZO (42) constatent l'accroissement de l'ammoniaque, des acides aminés, de l'acide urique et des bases puriques. ROCHE (243) comparant les variations

du rapport C/N de l'urine du rat entre les états de jeûne et d'avitaminose B trouve que ce rapport diminue dans le premier cas et croît dans le second, cette augmentation pouvant être réduite par l'administration de levure de bière.

Dans le sang, COLLAZO (42) observe de l'urémie chez le chien dans la période prémortelle de l'avitaminose, sauf chez les animaux qui meurent précocement.

Selon le même auteur, l'azote résiduel reste longtemps normal puis croît. Enfin, KARR (113), (114), réalisant chez le chien des expériences d'avitaminose B simple au moyen d'un régime synthétique défini, n'observe en définitive aucune modification du bilan azoté.

c) *Lipides*. — Déjà en 1914, FUNK avait noté l'action retardatrice qu'exercent les graisses sur l'évolution de l'avitaminose B chez le pigeon (84). Puis Mme RANDOIN et SIMONNET, au moyen de régimes artificiels totalement privés de glucides, montrèrent que des pigeons et des rats pouvaient vivre très longtemps en l'absence de vitamines B (236) (237) et l'action d'épargne exercée par les lipides fut confirmée chez le rat par EVANS et LEPKOWSKY (70). D'autre part, Mme RANDOIN et LECOQ (222) signalèrent que chez le pigeon, les lipides assuraient par leur présence, un meilleur équilibre alimentaire de la ration. Puis LECOQ aboutit à une conclusion analogue chez le rat, les lipides produisant un équilibre de la ration favorable à l'utilisation du lactose même en l'absence de vitamines B.

D'un autre côté, LECOQ fut amené à se demander si l'utilisation des lipides nécessitait la présence de vitamines B (128).

Constituant pour le pigeon de nombreux régimes artificiels sans glucides comportant des protides peptonisés ou non, il y fit varier les proportions puis la nature des lipides. Il observa qu'en présence de protides peptonisés, de larges proportions de lipides n'empêchent en aucun cas l'apparition de crises polynévritiques, et l'avitaminose B totale paraît évoluer d'autant plus rapidement que les lipides entrant dans le régime, sont plus digestibles. Par contre, l'addition de vitamines B suffit à assurer leur utilisation sauf toutefois dans le cas

de l'huile de ricin qui, par sa nature, est une cause de déséquilibre dans le régime.

Indépendamment de ces recherches, quelques auteurs ont cherché à étudier le trouble du métabolisme des lipides au cours de l'avitaminose B. Ils s'accordent en général, pour constater une hyperlipémie (COLLAZO et BOSCH [43], PALLADIN et KUDRIAZEWA [204], ASADA [9]) conjointement à une hypercholestérolémie. ABDERHALDEN et WERTHEIMER (2) ont également constaté de l'acétonémie contrairement à HANDEL (96) qui la nie et ne trouve pas non plus d'augmentation de l'acide β -oxybutyrique.

MÉTABOLISME MINÉRAL.

D'après COLLAZO (42) ou HIRABAYASHI (102), l'élimination du phosphore n'est pas modifiée chez le chien durant la première période d'avitaminose, mais elle est accrue dans la période prémortelle selon BICKEL (20) ou COLLAZO (42). PALLADIN et KUDRIAZEWA (204) trouvent que l'élimination du calcium, du phosphore et du chlore n'est pas modifiée chez le lapin. Par ailleurs, SCHAUHAN (247) montre que l'addition de levure semble améliorer l'utilisation du phosphore et du calcium chez des pigeons soumis au riz glacé, cependant qu'ANDERSON et KULP (8) estiment que les besoins du pigeon en phosphore sont déjà à peu près satisfaits par le régime de riz glacé. Enfin, l'assimilation du fer serait retardée par l'avitaminose B selon HARAMAKI (97).

II. — Influence de l'avitaminose B simple, totale ou fruste, sur le métabolisme glucidique du muscle de pigeon. (Recherches personnelles.)

Nous avons remarqué, au cours de cet exposé, que si certains chercheurs obtenaient des résultats disparates, ils le devaient à l'emploi de régimes insuffisamment définis. Aussi,

nous allons nous efforcer, dans nos expériences, d'employer un régime de base capable de réaliser une avitaminose B totale et rigoureusement simple.

CHOIX D'UN RÉGIME

teurs de polynévrite chez le pigeon est le riz blanc décortiqué donné à volonté mais il comporte en dehors de la carence en vitamine d'équilibre nerveux, de nombreuses insuffisances. Pour les combler, SALMON et LIVINGSTON (245) ont proposé la formule suivante :

Caséine purifiée.	20
Graisse de beurre	5
Riz décortiqué.	71
Agar-agar.	2
Phosphate bicalcique	0,5
Carbonate de calcium.	1
Chlorure de sodium.	0,5

Mais il est bien plus rationnel de donner des régimes synthétiques par gavage. Le gavage a, en effet, l'avantage de régulariser l'ingestion du régime, éliminant soit la voracité, soit l'anorexie des animaux, deux causes de perturbation dans la bonne marche des expériences.

Ainsi, SUGIURA et BENEDICT (261) ont préconisé le régime suivant qui est parfaitement équilibré :

Caséine purifiée	22
Graisse de beurre	30
Agar-agar.	2
Saccharose.	10
Mélange salin d'Osborne et Mendel.	3
Amidon q. s. p.	100

D'autre part, Mme RANDOIN et SIMONNET (234) ont obtenu des résultats tout à fait satisfaisants avec la formule :

Muscle purifié	7,5
Caséine purifiée.	8,5
Graisse de beurre	4
Dextrine.	66
Agar-agar.	8
Papier filtre.	2
Mélange salin d'Osborne et Mendel.	4

Puis Mme RANDOIN et LECOQ (216) ont constitué un régime très voisin producteur uniquement d'accidents névritiques, grâce à la présence d'extrait alcoolique de levure de distillerie séchée à l'air libre à 50° qui apporte les vitamines d'utilisation nutritive et d'utilisation cellulaire et vraisemblablement aussi la vitamine antipellagreuse, mais est rigoureusement exempt de vitamine antinévritique. Ce régime qui s'administre par gavage à la dose quotidienne de 20 gr. a la formule suivante :

Caséine purifiée	6
Fibrine purifiée.	5
Ovalbumine purifiée.	5
Graisse de beurre	4
Dextrine blonde	66
Agar-agar.	8
Papier filtre.	2
Mélange salin d'Osborne et Mendel.	4
Extrait alcoolique de levure de distillerie séché à l'air libre à 50° environ (par jour et par animal).	0,10

Comme nous nous sommes proposés de réaliser une avitaminose B simple mais globale, nous n'avons pas retenu l'usage de cet extrait alcoolique de levure. Mais nous avons noté l'emploi du régime dont l'équilibre se rapproche de celui que réalise un mélange de graines et qui est riche en glucides, ce qui est, semble-t-il, un avantage pour conduire des expérien-

ces intéressant leur métabolisme. Toutefois, il nous a semblé utile de simplifier nos expériences en substituant si possible le glucose à la dextrine. Or, cette substitution a été faite par Mme RANDOIN et LECOQ au cours d'expériences déjà citées (220) et ces auteurs ont montré qu'un tel régime répondant par conséquent à la formule :

Caséine purifiée.	6
Fibrine purifiée.	5
Ovalbumine purifiée.	5
Graisse de beurre.	4
Glucose pur.	66
Mélange salin d'Osborne et Mendel.	4
Agar-agar.	8
Papier filtre.	2

réalisait chez le pigeon, un équilibre nutritif satisfaisant puisqu'une dose de 0 gr. 50 de levure ajoutée quotidiennement assurait à l'animal une survie supérieure à six mois. D'autre part, en l'absence de levure, l'animal mourait régulièrement en 12 à 21 jours par avitaminose B, à la suite d'accidents polynévritiques.

Pour administrer ce régime par gavage à la ration quotidienne de 20 gr., on pèse cette quantité et on la triture dans une capsule ou mieux au mortier, au moment de nourrir l'animal, avec un volume d'eau distillée suffisant pour obtenir une pâte malléable, susceptible d'être introduite facilement et sans perte dans le jabot.

EXPÉRIMENTATION

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié l'influence de la carence totale en vitamines B sur la teneur en composés glucidiques du muscle de pigeon (54). Pour que nos résultats soient particulièrement nets, nous avons jugé utile de ne sacrifier les animaux que lors des manifestations les plus typiques de l'avitaminose B,

c'est-à-dire au cours des crises polynévritiques, en particulier au cours des crises paroxystiques qui précèdent de peu leur mort naturelle.

A cet effet, nous avons disposé d'une réserve de pigeons adultes normaux, d'un poids moyen de 350 gr., que nous avons soumis successivement à trois ou quatre jours d'intervalle, au régime à 66 % de glucose. Dès le régime commencé, l'animal était enfermé isolément dans une cage métallique à double fond (analogue à celles des rats, mais un peu plus grande). Nous lui donnions de l'eau distillée qu'il pouvait boire à volonté. Tous les jours avant le gavage, sa température était prise et, dès le dixième jour de régime, nous surveillions l'apparition des crises. Nous avons alors assisté à tous les symptô-



FIG. 14. — Variations moyennes du poids de pigeons recevant un régime à 66 p. 100 de glucose carencé en vitamines B.

mes classiques de la polynévrite aviaire. Une première crise toxique intense nous a tué brutalement deux animaux la nuit précédant le douzième jour, sans que nous puissions analyser leurs muscles. Les autres franchissant ce cap présentaient de la diarrhée souvent teintée de pigments biliaires

verdâtres. Nous notions un abaissement constant de la température et une perte de poids s'accroissant de jour en jour, tandis que les crises convulsives se déclenchaient, marquées dans la période prémortelle par des troubles cérébelleux, l'animal tournant sur lui-même. C'est au milieu de crises de cet ordre que nous avons pu sacrifier au quatorzième jour, deux ani-

Tableau I

Durée du régime	Pigeons au régime rel.	Pigeons au régime à 66 o/o de glucose				Moyennes
		12 j.	13 j.	14 j.	14 j.	
Composés réducteurs glucidi- ques totaux	143	227	201	218	220	216
Acide lactique	220	239	260	231	265	248
Orthophosphates	85	130	120	116	131	124
Acide créatinephosphorique..	12	5	8	6	7	6,5
Acide adénylpyrophospho- rique	27	18	20	31	19	22
Esters facilement hydro- lysables ..	18	16	20	23	20	19,7
Phosphore total acidoso- luble	173	219	222	227	229	224
Orthophosphates x 100	49,4	59,3	54	51	57	55,3
Phosphore total						
Acide créatinephospho- rique x 100	6,8	2,2	3,6	2,6	3	2,9
Phosphore total						
Acide adénylpyrophos- phorique x 100 ..	14,8	8,2	9	13,7	8,2	9,8
Phosphore total						
Esters facilement hydro- lysables x 100 ..	10,8	7,3	9	10,1	8,7	8,7
Phosphore total						

maux qui, étant donné leurs courbes de poids et de température, étaient certainement en imminence de mort naturelle.

Deux autres pigeons furent encore tués au milieu de crises violentes, respectivement au douzième et au treizième jour de régime.

Nous donnons ci-dessous les résultats obtenus sur leurs muscles pectoraux et nous en rapprochons les moyennes relatives aux pigeons recevant une alimentation variée naturelle.

On voit qu'au cours de l'avitaminose totale, les composés réducteurs glucidiques totaux, l'acide lactique, les orthophosphates et le phosphore total acidosoluble augmentent nettement puisque tous les résultats se groupent toujours au-dessus de la normale. Les valeurs moyennes normales peuvent même être dépassées de 58 % pour les glucides totaux, de 20 % pour l'acide lactique, de 54 % pour les orthophosphates et de 32 % pour le phosphore total acidosoluble.

Le rapport des orthophosphates au phosphore total acidosoluble est d'ailleurs toujours supérieur à la normale.

L'acide créatinephosphorique, par contre, diminue notablement, sa valeur moyenne au cours de l'avitaminose atteignant à peu près la moitié de sa valeur moyenne normale, et son rapport au phosphore total tombant très bas par suite de l'augmentation de ce dernier.

Enfin, les autres composés labiles ne présentent pas de variations notables ou significatives.

Ces résultats étant acquis, nous avons dans une deuxième série d'expériences, étudié l'influence sur la composition glucidique du muscle de pigeon, de l'emploi du même régime de base complété par des doses variables de levure de bière pendant des durées également variables.

Nous avons alors disposé d'un lot de cinq pigeons.

Le premier, gavé pendant un mois, eut son régime complété chaque jour par 2 gr. de levure de bière sèche. Le deuxième et le troisième gavés pendant huit mois eurent leur régime complété respectivement par des additions quotidiennes de 0 gr. 50 et de 4 gr. de levure. Enfin, c'est avec des compléments journaliers de 1 gr. et de 2 gr. de levure que le quatrième et le cinquième furent respectivement gavés pendant 11 mois. Au bout de chacune de ces durées, les animaux correspondants ont été sacrifiés.

Notons que seul le deuxième pigeon a présenté quelques signes de déséquilibre nerveux.

Vers le huitième mois, quelques jours avant de le tuer, nous avons en effet, observé de la parésie des muscles extenseurs des pattes et des ailes. Au contraire, tous les autres pigeons pendant toute la durée de ces expériences, ont conservé un aspect absolument normal.

Voici nos résultats groupés dans le tableau suivant :

Tableau II

Durée du régime	Pigeons au régime à 66 o/o de glucose				
	1 mois	8 mois		11 mois	
Dose complémentaire de levure ..	2 gr.	0 gr 50'	4 gr.	1 gr.	2 gr.
Composés réducteurs glucidiques totaux	195	231	220	258	295
Acide lactique	214	295	215	260	201
Orthophosphates	80	102	84	96,8	73,5
Acide créatinephosphorique	10	7	14	7,6	6
Acide adénylpyrophosphorique ...	29	19	23	22,6	18
Esters facilement hydrolysables.	25	22	19	24,6	17,5
Phosphore total acidosoluble ...	179	197	196	213	165
Orthophosphates x 100	44,6	51,7	42,8	45,4	44,5
Phosphore total					
Acide créatinephosphorique x 100	5,5	3,5	7,1	3,5	3,6
Phosphore total					
Acide adénylpyrophosphorique x 100	16,2	9,6	11,7	10,7	10,9
Phosphore total					
Esters facilement hydrolysables x 100	13,9	11,1	9,6	11,6	10,6
Phosphore total					

Leur examen nous montre que, comparativement au régime naturel, on observe partout une augmentation du bloc glucidique. L'acide lactique subit, semble-t-il, une légère augmentation dans le cas du régime à 1 gr. de levure maintenu onze

mois et celle-ci est particulièrement nette dans le cas du régime à 0 gr. 50 de levure maintenu huit mois puisqu'elle atteint 35 % de la valeur moyenne normale.

Les orthophosphates et le phosphore total acido-soluble semblent, eux aussi, nettement influencés par les régimes à 1 gr. et à 0 gr. 50 de levure. Ils augmentent, en effet, respectivement de 13 % et de 23 % de la valeur moyenne après onze mois du régime à 1 gr., puis de 20 % et de 12 % après huit mois de régime à 1 gr. 50.

Tous les autres résultats sont à peu près normaux.

Que faut-il conclure ?

1) En ce qui concerne l'avitaminose B totale, il est incontestable que le métabolisme des glucides du muscle est considérablement perturbé.

Le trouble se manifeste au premier chef par une augmentation de l'acide lactique. D'où peut venir cette imprégnation lactique ?

Il est possible que, comme dans le cas du scorbut, le muscle respire mal et que l'acide lactique provenant de la dégradation des glucides s'accumule, ne pouvant plus reformer de glycogène grâce à la réaction de Pasteur-Meyerhof. Le trouble constaté dans le métabolisme du phosphore vient à l'appui d'une telle hypothèse. Les orthophosphates, en effet, augmentent, mais le phosphore total n'augmente pas d'une façon aussi importante. D'autre part, l'acide créatinephosphorique a une valeur toujours inférieure à la normale et, par suite, son rapport au phosphore total est très bas. Il semble donc qu'il diminue au profit des orthophosphates, en un mot qu'il s'hydrolyse et se resynthétise avec difficulté. Etant donné le grand nombre de contractions musculaires qui accompagnent les crises de polynévrite, il est certain que cet acide s'hydrolyse considérablement et, comme sa resynthèse se fait, nous l'avons vu, peut-être pour une part en anaérobiose aux dépens des acides aminés mais certainement en aérobie grâce aux calories apportées par la respiration, on peut penser que cette dernière est insuffisante.

Cette hypothèse a d'ailleurs été signalée postérieurement à nos résultats par NITZESCU, BENETATO et OPREAN (197 bis). Chez le pigeon en avitaminose B₁, ces auteurs ont observé dans le muscle une diminution de la respiration qu'ils ont mesurée directement par la méthode de WARBURG.

On pourra cependant objecter que l'acide lactique reforme toutefois du glycogène puisqu'on observe une augmentation parallèle du bloc glucidique. Un tel argument ne tient pas. Il suffit de jeter un coup d'œil sur les résultats des régimes dûment complétés pour constater qu'on retrouve toujours cette augmentation avec un régime de base glucosé à 66 %. Il y a probablement imprégnation de l'organisme du pigeon en glucose par suite de la facilité d'assimilation de ce glucide et l'avitaminose B totale ne semble nullement en relation avec une augmentation du bloc glucidique réducteur dans le muscle.

Il est toutefois plus vraisemblable de penser que l'acide lactique trouvé en excès dans le muscle fait partie du cortège des substances toxiques qui résultent de la non utilisation des glucides au cours de l'avitaminose et qui doivent imprégner les principaux organes, notamment les muscles.

Cette conclusion nous semble d'autant plus logique qu'elle corrobore d'une part, les résultats de LECOQ et, d'autre part, ceux de KINNERSLEY, PETERS, FISHER, THOMPSON et JOHNSON.

2) Si nous comparons les résultats des deux tableaux de ce chapitre, nous voyons qu'une dose de 0 gr. 50 de levure, habituellement considérée comme minima, n'empêche pas le développement d'une avitaminose fruste qui se traduit au huitième mois, par un trouble du métabolisme des glucides analogue à celui de l'avitaminose totale et, nous l'avons remarqué, par des crises larvées de polynévrite.

Fait remarquable, le taux de l'acide lactique dans ce cas, est encore plus élevé qu'au cours des crises paroxystiques de la carence totale.

Ainsi, nous basant sur les conclusions précédentes, nous pouvons dire que huit mois d'utilisation déficiente du glucose par suite d'une carence fruste en vitamines B conduisent l'organisme du pigeon à un degré d'intoxication lactique encore

plus manifeste que dans la période prémortelle de l'avitaminose totale.

L'addition de 1 gr. de levure n'entraîne aucune manifestation polynévritique sensible et cependant, là encore, la composition glucidique du muscle subit des variations, légères il est vrai, mais parallèles à celles qu'on observe dans l'avitaminose. Il semble donc que l'analyse du muscle nous ait révélé une avitaminose inapparente.

Enfin, des doses quotidiennes de 2 gr. de levure pendant un ou onze mois et de 4 gr. pendant huit mois, semblent suffisantes pour compléter parfaitement le régime glucosé à 66 % puisqu'on n'observe dans ces cas ni accidents polynévritiques, ni trouble du métabolisme des glucides dans le muscle.

CHAPITRE IX

LE DESEQUILIBRE ALIMENTAIRE ET LE METABOLISME DES GLUCIDES DANS LE MUSCLE

La valeur nutritive des substances appartenant à un même groupe de la fraction organique est différente selon leur nature.

En particulier, nous avons vu que le besoin de vitamines B varie chez le pigeon avec le degré de digestibilité et de rapidité d'assimilation des glucides présents dans la ration.

Cependant, ceci n'est vrai que si la ration est constituée avec ce que LECOQ appelle des substances d'équilibre, pouvant entrer en n'importe quelle proportion dans un régime, sans y apporter par leur nature chimique, d'influence nocive. A cet équilibre organique alimentaire, s'oppose la notion de déséquilibre que nous allons étudier.

I. — Le déséquilibre alimentaire

La notion de déséquilibre alimentaire résulte initialement des expériences déjà citées de Mme RANDOIN et LECOQ (220) portant sur des régimes artificiels dans lesquels des glucides comme le galactose ou le lactose, introduits à la dose de 66 %, produisent chez le pigeon des accidents polynévritiques bientôt suivis de mort, malgré la présence de larges doses de vitamines B.

De tels glucides employés à cette dose se montrent donc incapables d'assurer l'équilibre de la ration.

Nous avons déjà signalé un cas de déséquilibre alimentaire à propos du rachitisme expérimental, mais il s'agissait là d'un déséquilibre proprement minéral et associé à l'avitaminose D. Ici les phénomènes sont différents puisqu'on obtient la poly-névrite en présence de vitamines B.

LECOQ devait peu après, étendre ses expériences pour généraliser la notion de déséquilibre alimentaire non seulement à d'autres glucides, mais à toute la fraction organique de la ration, caractérisant ainsi de nombreuses substances de déséquilibre. Il a montré en particulier, que l'introduction dans un régime de fortes proportions de lévulose, de sorbite, de mannite, de gomme du Sénégal, d'huile de ricin, de peptone de muscle, de peptone d'ovalbumine, entraîne un déséquilibre alimentaire que dans les mêmes conditions, le glucose, le maltose, le saccharose, la dextrine et l'amidon, les huiles d'olive ou d'arachide, le saindoux et le beurre de coco, la peptone de fibrine, la poudre de viande et la caséine ne produisent pas parce que ce sont des substances d'équilibre. La preuve du déséquilibre est faite par la possibilité de réaliser un équilibre *strict* permettant l'utilisation des substances de déséquilibre en les faisant intervenir dans la ration dans des proportions rigoureusement déterminées.

En ce qui concerne le lactose par exemple, l'équilibre de la ration est réalisé dans les expériences de Mme RANDOIN et LECOQ en faisant intervenir ce glucide non plus à la proportion de 66 % mais de 35 % seulement. En présence d'une dose optima de vitamines B correspondant à 0 gr. 35 de levure de bière, les survies obtenues chez le pigeon sont supérieures à six mois. L'équilibre réalisé dans un tel régime est d'ailleurs voisin de celui qu'on observe dans le lait de vache.

Le lait de vache entier est donc un exemple naturel de régime équilibré. Cet équilibre cesse dans le lait écrémé, dans le babeurre ou le petit lait. La similitude des accidents nerveux observés aussi bien au cours de l'avitaminose B que du

déséquilibre alimentaire a conduit LECOQ à penser que l'origine de ces troubles était analogue et correspondait dans les deux cas, au même déséquilibre humoral et il fit, pour vérifier cette hypothèse, les expériences suivantes :

Il ajouta (en collaboration avec VILLETTE [139]), des bacilles lactiques à une ration équilibrée à 66 % de glucose et complétée ou non par de la levure de bière. Administrée à des pigeons, cette ration parut exagérer leurs besoins en vitamines B puisque dans certains cas des crises polynévritiques très nettes se produisirent.

Des recherches similaires conduites avec une ration équilibrée à 35 % provoquèrent d'autre part, chez le pigeon, des manifestations atténuées de déséquilibre alimentaire, comparables à celles qui s'observent avec le lactose (130). Les résultats furent encore du même ordre en ajoutant 5 % d'acide lactique à un régime à 66 % de saccharose, les besoins des pigeons en vitamines B se trouvant nettement exagérés (131).

Enfin, ainsi que nous l'avons signalé à propos de l'avitaminose, LECOQ, généralisant cette dernière expérience, reproduisit la polynévrite chez le pigeon, par addition de 10 % d'acide lactique à des régimes tour à tour riches en glucides, en protides ou en lipides (132).

Ainsi, l'imprégnation lactique des tissus signalée par KINNERSLEY, PETERS, FISCHER, THOMPSON et JOHNSON à propos de l'avitaminose, semblait être la cause générale de la polynévrite aviaire.

Par ailleurs, LECOQ et JOLY (137) ont montré que dans le déséquilibre glucidique comme dans l'avitaminose, le quotient respiratoire diminue et le métabolisme de base s'exagère.

Etant donné que nous venions de vérifier l'imprégnation lactique des muscles au cours de l'avitaminose, il devenait d'un intérêt passionnant de le faire au cours du déséquilibre. Notre Maître nous a demandé tout d'abord de vérifier *in situ*, que l'ingestion de bacilles lactiques, d'acide lactique et de lactate de soude correspondait bien à une imprégnation lactique du muscle et, ultérieurement, nous avons étudié ensemble les modifications produites par le déséquilibre glucidique aigu.

II. — Influence de l'ingestion de bacilles lactiques, d'acide lactique et de lactate de soude sur le métabolisme glucidique du muscle de pigeon. (Recherches personnelles.)

A. — Dans une première série d'expériences, nous avons ajouté des BACILLES LACTIQUES au régime varié naturel de deux pigeons normaux.

A cet effet, nous avons nourri ces animaux par gavage, leur administrant quotidiennement 20 gr. de graines broyées auxquelles nous avons incorporé 5 milliards de bacilles lactiques.

Les bacilles avaient été initialement isolés d'une préparation pharmaceutique puis cultivés et incorporés à du saccharose selon une technique donnée par VILLETTE (268). Le saccharose était, en effet, préférable au lactose, car ce glucide habituellement employé comme support, aurait pu, ici, déséquilibrer la ration.

Notre sucre lactique contenant 2 milliards 500 millions de bacilles lactiques par gramme, nous en ajoutons 2 gr. à 20 gr. de graines broyées. Le tout était trituré au mortier avec la quantité d'eau suffisante pour obtenir une masse pâteuse susceptible d'être administrée facilement par gavage.

Le régime fut maintenu dix-huit jours durant lesquels les pigeons ne présentèrent ni signes de polynévrite, ni chute de poids appréciable.

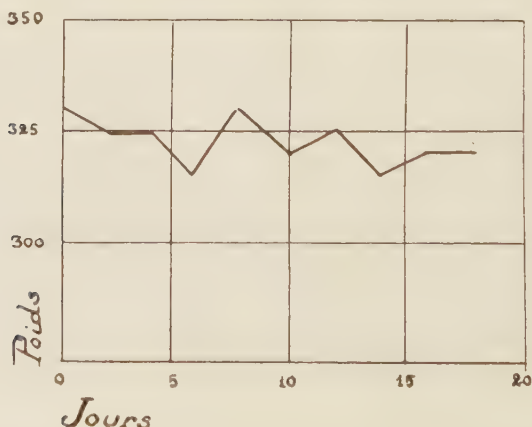


FIG. 15. — Variations moyennes du poids de pigeons recevant un mélange de graines et des bacilles lactiques à la dose quotidienne de 5 milliards.

Au bout de ce temps, ils furent sacrifiés et l'analyse de leurs muscles nous donna les résultats suivants dont, par commodité, nous avons encore rapproché les moyennes relatives au régime varié naturel seul.

Tableau I

Durée du régime	Régime varié naturel Moyennes	Régime varié naturel + bacilles lactiques		
		18 jours	18 jours	moyennes
Composés réducteurs glucidiques, totaux	143	97	115	106
Acide lactique	220	316	260	288
Orthophosphates	85	85	81	83
Acide créatinephosphorique	13	7	9	8
Acide adénylpyrophosphorique ...	27	30	24	27
Esters facilement hydrolysables ..	18	14	18	16
Phosphore total acidosoluble ...	173	181	141	161
Orthophosphates x 100	49,4	46,9	57,4	52,1
Phosphore total				
Acide créatinephosphorique x 100	6,8	3,6	6,3	5
Phosphore total				
Acide adénylpyrophosphorique x 100	14,8	16,5	17	16,7
Phosphore total				
Esters facilement hydrolysables x 100	10,8	7,7	12,7	10,2
Phosphore total				

On voit que le taux de l'acide lactique subit une augmentation particulièrement nette et qui peut atteindre 43 % de la valeur normale.

Les autres substances, par contre, ne subissent que des variations absolument insignifiantes.

B. — Dans une deuxième série d'expériences conduites également sur deux pigeons pendant 18 jours, nous avons substi-

tué aux bacilles lactiques, l'ACIDE LACTIQUE à la dose quotidienne de 1 gr. A cet effet, nous avons, au moment du gavage de chaque animal, incorporé aux 20 gr. de graines, 10 cc. d'une solution titrée d'acide lactique à 10 %.

Nos pigeons n'ont présenté aucun signe apparent de poly-névrite, mais nous avons noté une chute de poids appréciable

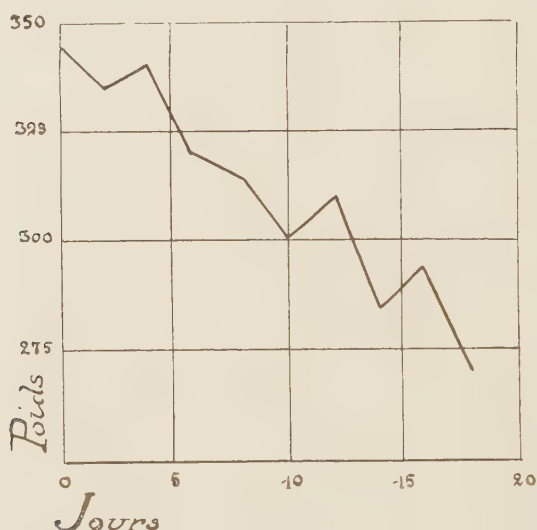


FIG. 15. — Variations moyennes du poids de pigeons recevant un mélange de graines, et de l'acide lactique à la dose quotidienne de 1 gr.

L'analyse de leurs muscles nous donna les résultats consignés dans le tableau II.

On voit que là, encore, l'acide lactique a augmenté. Il semble de plus, que les orthophosphates aient tendance à diminuer, ce qui entraîne une diminution parallèle du phosphore total acidosoluble.

C. — Il nous a semblé alors intéressant de voir si l'imprégnation lactique serait du même ordre avec le LACTATE DE SODIUM. A cet effet, nous avons recommencé les mêmes expé-

riences en ajoutant à la ration quotidienne de chaque animal 1 gr. 24 de lactate de sodium représentant 1 gr. d'acide lactique neutralisé.

Ce sel dissous dans une quantité d'eau suffisante, était incorporé au mortier, aux graines broyées.

Nos pigeons, comme précédemment, ne présentèrent aucun symptôme de polynévrite, mais leur poids diminua.

Tableau II

Durée du régime	Régime varié naturel + acide lactique		
	18 jours	18 jours	Moyenne
Composés réducteurs glucidiques totaux	131	190	160
Acide lactique	238	278	258
Orthophosphates	70	70	70
Acide créatinephosphorique	9	7,8	8,4
Acide adénylpyrophosphorique	24	15,3	19,6
Esters facilement hydrolysables ..	19	21	20
Phosphore total acidosoluble	134	130	142
Orthophosphates x 100	45,4	53,8	49,6
Phosphore total			
Acide créatinephosphorique x 100	5,8	6	5,9
Phosphore total			
Acide adénylpyrophosphorique x 100	15,5	11,7	13,6
Phosphore total			
Esters facilement hydrolysables x 100	12,8	16,1	14,2
Phosphore total			

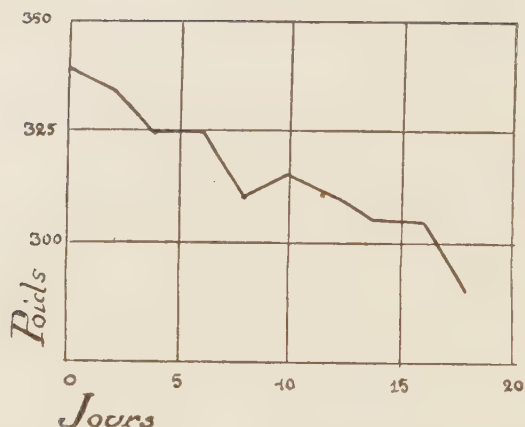


FIG. 16. — Variations moyennes du poids de pigeons recevant un mélange de graines, et du lactate de sodium à la dose quotidienne de 1 gr. 24.

Tableau III

Durée du régime	Régime varié naturel + lactate de sodium		
	18 jours	18 jours	moyenne
Composés réducteurs glucidiques totaux	188	176	182
Acide lactique	251	260	255
Orthophosphates	65	68	66,5
Acide créatinephosphorique	7	13	10
Acide adénylpyrophosphorique	29	25	27
Esters facilement hydrolysables ..	16	18	17
Phosphore total acidosoluble	152	160	156
Orthophosphates x 100	42,7	42,5	42,6
Phosphore total			
Acide créatinephosphorique x 100	4,6	8,1	6,3
Phosphore total			
Acide adénylpyrophosphorique x 100	19	15,6	17,3
Phosphore total			
Esters facilement hydrolysables x 100	10,5	11,2	10,8
Phosphore total			

On remarque immédiatement que les chiffres de ce nouveau tableau sont très voisins de ceux du précédent.

Nous pouvons donc finalement tirer de ces expériences les conclusions suivantes :

1) Des doses quotidiennes de 5 milliards de bacilles lactiques ou de 1 gr. d'acide lactique libre ou neutralisé, ajoutées à un régime varié naturel, semblent insuffisantes pour provoquer des accidents polynévritiques chez le pigeon.

2) Par contre, de telles ingestions entraînent une imprégnation lactique manifeste des muscles de cet animal.

3) L'imprégnation lactique musculaire semble plus importante lorsque l'acide lactique ingéré n'est pas préformé, mais prend naissance dans l'organisme aux dépens des glucides de la ration (cas de bacilles lactiques).

4) L'ingestion d'acide lactique libre ou neutralisé s'accompagne d'une chute de poids de l'animal et d'une diminution dans ses muscles, des orthophosphates et du phosphore total acidosoluble.

5) Dans tous les cas, le trouble du métabolisme des glucides dans le muscle semble conditionné essentiellement par l'exagération du taux de l'acide lactique.

III. — Influence de l'ingestion d'un régime de déséquilibre alimentaire aigu sur le métabolisme glucidique du muscle de pigeon.

Lorsqu'on substitue le galactose au glucose dans le régime dérivé du régime RANDOIN-SIMONNET, dont nous nous sommes servis pour réaliser l'avitaminose, le déséquilibre alimentaire qui en résulte se montre particulièrement aigu. Les survies des animaux en expérience sont, en effet, de 8-15 jours malgré l'addition quotidienne de levure de bière, que celle-ci soit de 0 gr. 50, de 1 gr., de 2 gr. ou de 4 gr.

Aussi, ce régime était tout indiqué pour nous permettre d'étudier dans les meilleures conditions, l'influence du déséquilibre alimentaire sur le métabolisme glucidique du muscle.

Nous avons alors entrepris une nouvelle série d'expériences en collaboration avec notre maître LECOQ (136).

Etant donné la faible durée des survies, il nous a paru intéressant d'étudier les variations de la composition du muscle en fonction du temps. A cet effet, nous avons utilisé huit pigeons normaux auxquels nous avons donné individuellement, par gavage, 20 gr. du régime à 66 % de galactose complété par 4 gr. de levure de bière.

Les animaux enfermés dans des cages métalliques comme dans le cas de l'avitaminose, ont été étroitement surveillés puis tués volontairement par groupes de deux au bout de 2, 4, 5 et 6 jours, soit en état de crise, soit en l'absence de crises polynévritiques. Nous avons groupé tous les résultats obtenus dans le tableau qui suit. Notons que les sujets n^{os} 1 et 2 ont présenté de la parésie des pattes sans crises typiques, les n^{os} 3, 6 et 8 ont été sacrifiés à distance des crises, les n^{os} 4, 5 et 7, par contre, ont été tués en pleine crise. (Ci-dessous la courbe de poids moyenne des pigeons n^{os} 7 et 8.)

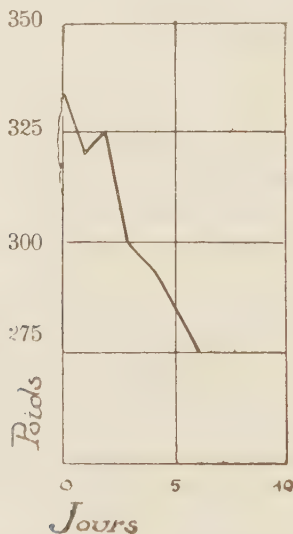


FIG. 18. — Variations moyennes du poids de pigeons recevant un régime à 66 p. 100 de galactose complété quotidiennement par 4 gr. de levure de bière. (Déséquilibre glucidique).

Tableau IV

Numéro des pigeons	Régime à 86 o/o de galactose + 4 gr. de levure							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Durée du régime	2 j.	2 j.	4 j.	4 j.	5 j.	5 j.	6 j.	6 j.
Composés réducteurs glucidiques totaux	204	170	196	227	195	348	364	268
Acide lactique	286	260	273	260	323	356	337	276
Orthophosphates	95	75	79	119	98	131,5	98	126
Acide créatinephosphorique	3,5	10	9,9	10	6	10	9	19
Acide adénylpyrophosphorique	15,5	20	22,1	18	21	20	21	15
Esters facilement hydrolysables	18	19	17	20	19	21	20	22
Phosphore total acidosoluble	161	171	177	216	179	240	187	257
Orthophosphates x 100	59	43,8	44,6	55	54,7	54,7	52	49
Phosphore total								
Acide créatinephosphorique x 100 ..	2,1	5,8	5,5	4,6	3,3	4,1	4,8	7,3
Phosphore total								
Acide adénylpyrophosphorique x 100 ..	9,6	11,6	12,4	8,3	11,7	8,3	11,2	5,8
Phosphore total								
Esters facilement hydrolysables x 100	11,1	11,1	9,6	9,2	10,6	8,7	10,6	8,5
Phosphore total								

En comparant ces résultats avec les valeurs normales, on peut constater que les composés réducteurs glucidiques totaux, l'acide lactique, les orthophosphates et le phosphore total acidosoluble ont dans presque tous les cas un taux supérieur à la normale, ces augmentations nettes dès le deuxième jour, sont en général plus sensibles après le cinquième jour. C'est ainsi qu'on peut noter au sixième jour pour les composés réducteurs glucidiques, une augmentation atteignant 154 % de leur valeur normale; au cinquième jour c'est une augmentation de 62 % pour l'acide lactique et de 54 % pour les orthophosphates, de 48 % enfin au sixième jour pour le phosphore total acidosoluble.

L'acide adénylpyrophosphorique durant toute la durée des expériences a, par contre, toujours un taux inférieur à la nor-

male (29 % de différence en moyenne), le phosphore total augmentant, le rapport phosphorique correspondant s'abaisse notablement.

Il en serait de même pour l'acide créatinephosphorique si ce n'était l'irrégularité observée avec le pigeon n° 8.

Que faut-il en conclure ?

1) Les variations observées d'un animal à l'autre montrent la différence de sensibilité de l'organisme des pigeons au déséquilibre alimentaire.

2) Le déséquilibre alimentaire aigu d'origine glucidique comme dans l'avitaminose B totale, s'accompagne d'une imprégnation lactique importante du tissu musculaire, et d'une augmentation du taux des orthophosphates et du phosphore total acidosoluble.

3) On observe également une augmentation très importante des composés réducteurs glucidiques totaux qui n'est pas due, comme dans l'avitaminose B, à l'ingestion prolongée d'un régime glucidique.

4) Si l'apparition des crises polynévritiques semble en rapport avec l'accumulation d'acide lactique dans les tissus, elle ne paraît cependant pas en relation avec une exagération momentanée de son taux.

5) La tendance à la baisse des acides créatine et adénylpyrophosphoriques achève de nous montrer que le métabolisme glucidique du muscle est considérablement troublé.

L'hypothèse d'un défaut de respiration du muscle paraît beaucoup moins justifiable à priori que dans le cas de l'avitaminose puisque l'imprégnation lactique s'accompagne parallèlement d'une imprégnation de glucides réducteurs.

Elle peut cependant se soutenir pour expliquer la difficulté de resynthèse aérobie des co-ferments musculaires, si on considère que l'élévation du taux des glucides réducteurs ne vient pas forcément d'une synthèse aérobie du glycogène. Nous pensons même qu'il est plus vraisemblable d'admettre que le pouvoir réducteur élevé du muscle provient de l'accumulation, dans l'organisme, de produits de déchets qui, comme l'acide lactique, résultent de la non-utilisation des glucides.

Ainsi, la preuve semble définitivement établie que l'accumulation de produits toxiques dans l'organisme ou tout au moins dans le muscle, est la cause générale de la polynévrite aviaire aussi bien dans le cas de l'avitaminose que dans le cas du déséquilibre.

A titre de curiosité, nous avons voulu voir quelle serait la répercussion sur le muscle d'un état d'avitaminose aggravé de déséquilibre.

A cet effet, nous avons soumis un pigeon normal au régime à 66 % de galactose sans levure pendant six jours. Au sixième jour, nous avons eu la chance de le surprendre au moment où il expirait dans une crise de polynévrite particulièrement dramatique.

Voici sa courbe de poids.

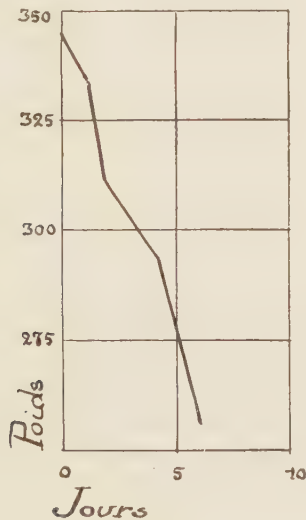


FIG. 19. — Variations du poids d'un pigeon recevant un régime à 66 p. 100 de galactose sans levure. (Déséquilibre glucidique et avitaminose).

Tableau V

Composés réducteurs glucidiques	174
Acide lactique	554
Orthophosphates	142
Acide créatinephosphorique	9
Acide adénylpyrophosphorique	11
Esters facilement hydrolysables	12
Phosphore total acidosoluble	104
Orthophosphates x 100	73,1
Phosphore total	
Acide créatinephosphorique x 100 ...	4,6
Phosphore total	
Acide adénylpyrophosphorique x 100 ..	5,6
Phosphore total	
Esters facilement hydroly-	
sables x 100	6,1
Phosphore total	

L'augmentation des composés réducteurs glucidiques peu élevée s'explique par une baisse du glycogène due à l'asphyxie du muscle, conjointement à un apport de substances toxiques réductrices ; et, pour l'acide lactique et les orthophosphates, il est incontestable que les effets de l'avitaminose et du déséquilibre qui sont parallèles, s'ajoutent.

CONCLUSIONS

L'étude du métabolisme des glucides dans le muscle nécessite la mise en œuvre de méthodes de dosage dont nous avons discuté la valeur, précisant et modifiant quand il était besoin, le détail de certaines d'entre elles, en vue de les appliquer à l'étude du muscle des principaux animaux de laboratoire.

Pour une espèce déterminée, le taux des principales substances participant au métabolisme des glucides se révèle, en général, suffisamment fixe, pour qu'il puisse servir de test à des recherches expérimentales sur la nutrition.

L'avitaminose A ne semble entraîner dans le muscle du rat aucune modification sensible du métabolisme des glucides, quelle que soit la durée de son évolution.

Le rachitisme expérimental (avitaminose D associée à un déséquilibre phosphocalcique) provoque dans le muscle du rat une perturbation du métabolisme des glucides, conditionnée par une augmentation du phosphore minéral et une baisse du phosphore organique. La guérison par la vitamine D à dose thérapeutique, semble avoir pour effet, de libérer du muscle le phosphore minéral emmagasiné pendant la durée du trouble nutritif pour le fixer sur les os, tandis que le muscle récupère du phosphore sous la forme organique. La vitamine D à forte dose paraît, par contre, libérer brutalement le phosphore minéral du muscle avant que le phosphore organique ait eu le temps d'y pénétrer. La guérison par le phosphore actif sous forme d'acide phosphorique ou de β -glycérophosphate de sodium se traduit par une imprégnation orthophosphorique du muscle dans le premier cas, doublée d'une imprégnation glycérique dans le second.

La production expérimentale du scorbut (avitaminose C) chez le cobaye, déclenche dans le muscle un trouble du métabolisme des glucides qui se traduit par une diminution du bloc réducteur et une augmentation de l'acide lactique tandis que le métabolisme interne du phosphore n'est pas sensiblement modifié. On peut en déduire que, dans de telles conditions, la respiration du muscle se fait mal. La guérison par une dose thérapeutique de jus de citron semble favoriser la resynthèse du glycogène aux dépens de l'acide lactique. Cette resynthèse s'exagère encore sous l'influence de doses élevées d'acide ascorbique.

L'avitaminose B totale, productrice de polynévrite aviaire expérimentale entraîne dans le muscle un trouble profond du métabolisme des glucides, conditionné par une augmentation de l'acide lactique des orthophosphates et du phosphore total acidosoluble et une diminution de l'acide créatinephosphorique. On peut penser que, dans ce cas encore, la respiration musculaire est entravée, mais il est plus vraisemblable d'admettre que l'acide lactique qui imprègne le muscle provient de la non utilisation des glucides. L'avitaminose B fruste provoque des troubles du métabolisme glucidique musculaire analogues à ceux de l'avitaminose totale, de sorte que l'analyse du muscle permet réciproquement de diagnostiquer une avitaminose cliniquement inapparente.

L'ingestion de bacilles lactiques, d'acide lactique ou de lactate de soude se traduit par une imprégnation lactique du muscle.

Le déséquilibre alimentaire d'origine glucidique provoque malgré l'apport d'une large proportion de vitamines B, une perturbation importante du métabolisme glucidique du muscle. Celle-ci se traduit, comme dans l'avitaminose B, par une augmentation de l'acide lactique, des orthophosphates et du phosphore total acidosoluble et, en outre, par une augmentation des composés réducteurs glucidiques totaux.

En définitive, l'avitaminose A n'entraîne dans le muscle aucun trouble du métabolisme des glucides, mais celui-ci est plus ou moins perturbé au cours des avitaminoses D, C, B et

du déséquilibre alimentaire d'origine glucidique. Le trouble porte surtout sur le métabolisme du phosphore dans l'avitaminose D et sur le bilan de la dégradation glycogénique dans l'avitaminose C. Par contre, dans l'avitaminose B comme dans le déséquilibre alimentaire, il intéresse tout l'ensemble du métabolisme.

Vu :

LE DOYEN,

P. GUÉRIN.

Vu :

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,

J. BOUGAULT

LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,

Vu et permis d'imprimer :

S. CHARLETY.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABDERHALDEN (E.). — Weitere Beiträge zur Kenntnis von organischen Nahrungsstoffen mit spezifischer Wirkung. IV Mitteil. (*Arch. ges. Phys.*, 1921, **187**, p. 80).
2. ABDERHALDEN (E.) et WERTHEIMER (E.). — Weitere beiträge zur Kenntnis von organischen Nahrungsstoffen mit spezifischer Wirkung. XIII Mitteil. (*Arch. ges. Phys.*, 1922, **194**, p. 647).
3. — Weitere beiträge zur Kenntnis von organischen Nahrungsstoffen mit spezifischer Wirkung. XVIII Mitteil. (*Arch. ges. Phys.*, 1922, **195**, p. 460).
4. ABRAHAM (A.). — Biochemistry of scurvy. (*Klin. Wochft.*, 1928, **7**, p. 353).
5. ACKERSON (C.-W.), BLISH (M.-J.) et MUSSEHL (F.-E.). — A study of phosphorus, calcium and alkaline reserve of the blood sera of normal and rachitic chicks. (*Journ. Biol. Chem.*, 1925, **63**, p. 75).
6. ADACHI (A.). — Ueber den Harnsaure und Allandoinstoffwechsel bei Avitaminose. (*Bioch. Zeit.*, 1923, **143**, p. 408).
7. AHLGREEN (G.). — Avitaminose und Gewebeatmung. (*Skand. Arch. Phys.*, 1923, **44**, p. 186).
8. ANDERSON (R.-J.) et KULP (W.-L.). — A study of the metabolism and respiratory exchange in poultry during vitamin starvation and polyneuritis. (*Journ. Biol. Chem.*, 1922, **52**, p. 69).
9. ASADA (K.). — Der Fettstoffwechsel bei Avitaminose. I. Der gesamt fett gehalt und Cholesteringehalt des Körpers bei normaler und avitaminoser Ernährung. (*Bioch. Zeit.*, 1923, **141**, p. 44).
10. ASKEW, BOURDILLON, BRUCE, JENKINS et WEBSTER. — The distillation of vitamin D. (*Proc. Roy. Soc.* [1^{er} B], 1930, **107**, p. 76).
11. ASKEW, BOURDILLON, BRUCE, CALLOW, PHILPOT et WEBSTER. — Crystalline vitamine D (*Id.* 1931, **109**, p. 488.)
12. ASKEW, BOURDILLON, BRUCE, JENKINS et WEBSTER. — The effects of forther irradiation of the radiation products of ergosterol. (*Proc. Roy. Soc.*, 1930, **107**, p. 91).
13. BANG. — Der Blutzucker, Wiesbaden, 1913.

14. — Mikromethoden zur Blutuntersuchung, München, 1920.
15. BAUDOUIN (A.). — Le dosage des matières réductrices du sang. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, **10**, p. 977).
16. BAUMANN (L.) et HOWARD (C.). — The mineral metabolism of experimental scurvy in the guineapig. (*Ann. Journ. Med. Sc.*, 1917, **153**, p. 650).
17. BELL (R.-D.) et DOISY (E.-A.). — Rapid colorimetric method for determination of phosphorus in urine and blood. (*Journ. Biol. Chem.*, 1920, **44**, p. 55).
18. BERTRAND (G.). — Mise au point de la méthode de dosage du sucre. (*Bull. Soc. Chim. de France*, 20 décembre 1906).
19. BETHKE (R.-M.), STEENBOCK (H.) et NELSON (M.-T.). — Fat soluble vitamins. XV. Calcium and phosphorus relations to growth and composition of blood and bone with varying vitamin intake. (*Journ. Biol. Chem.*, 1923, **58**, p. 71).
20. BICKEL. — Das Wesen der Avitaminose nach experimentellen Untersuchungen über die admagedung Form dieser Krankheit. (*Bioch. Zeit.*, 1924, **146**, p. 473).
21. BLUM (L.), DELAVILLE (M.) et van CAULART. — Sur la pathogénie du rachitisme. Rapports entre les phénomènes d'ossification et de calcification et l'état physicochimique du sang. (*Presse Méd.*, 1925, p. 801).
22. BOUGAULT (J.). — Action de l'iode sur les alcalis. Emploi du réactif iode + alcali en analyse chimique. (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1917, **16**, p. 33).
23. — Nouvelle méthode de dosage des sucres aldéhydiques. (*Journ. Pharm. Chim.*, 1917, **16**, p. 97).
24. — Cours de chimie analytique (Faculté de Pharmacie de Paris). Melun, impr. administr., années 1931 à 1936.
25. BRADDON (W.-L.) et COOPER (E.-A.). — The influence of metabolic factors in beriberi. Part. I. The effect of increasing the carbohydrate ration on the development of polyneuritis in birds fed on polished rice. (*Journ. Hyg.*, 1914, **14**, p. 331).
26. BREAUDAT. — Sur les urines et sur le sang des béribériques. (*Bull. Soc. Path. Exot.*, 1910, **3**, p. 620).
27. BRIGGS (A.-P.). — A modification of the Bell-Doisy phosphate Method. (*Journ. Biol. Chem.*, 1922, **53**, p. 13).
28. — Some applications of the colorimetric phosphate method. (*Journ. Biol. Chem.*, 1924, **59**, p. 255).
29. CAHN (Hh.) et HOUGET (J.). — Biochimie de la contraction musculaire. Paris, Hermann et Cie, 1934.
30. CAHN (Th.), HOUGET (J.) et JACQUOT (R.). — Modifications chimiques accompagnant la contraction musculaire et l'hyperthermie. I. Descriptions et critiques des méthodes analytiques. (*Ann. Phys.*, 1933, **9**, n° 2, p. 205).

31. CANNAN (R.-K.) et SHORE (A.). — The creatine-creatinine equilibrium. The apparent dissociation constants of creatine and creatinine. (*Bioch. Journ.*, 1928, **22**, p. 920).
32. CARIDROIT (F.). — Contribution à l'étude du métabolisme des pigeons privés du facteur B. (*Journ. Phys. et Path. Gén.*, 1922, **20**, p. 189).
33. — Variation de l'excrétion azotée (azote total urinaire) au cours du scorbut expérimental. (*C. R. Soc. Biol.*, 1924, **90**, p. 1379).
34. CAWINS (A.-W.). — The effect of fasting (refeeding) on the calcium and inorganic phosphorus in blood serums of normal and rachitic rats. (*Journ. Biol. Chem.*, 1924, **59**, p. 237).
35. CHAUVÉAU (A.) et KAUFMANN (M.). — Expériences pour la détermination du coefficient de l'activité nutritive et respiratoire des muscles en repos et en travail. (*C. R. Acad. Sc.*, 1887, **140**, p. 1127).
36. CHELLE (L.). — Dosage clinique des glucides et de l'acide lactique du sang et des autres liquides de l'organisme. (*Bull. Soc. Ph. Bordeaux*, 1914).
37. CHICK (H.), HUME (E.-M.) et SKELTON (R.-F.). — The antiscorbutic value of cow's milk. (*Bioch. Journ.*, 1918, **12**, p. 135).
38. CLAUSEN (S.-W.). — A method for the determination of small amounts of lactic acid. (*Journ. Biol. Chem.*, 1922, **52**, p. 263).
39. COHEN (B.) et MENDEL (L.-B.). — Experimental scrumy of the guinea pig in relation to the diet. (*Journ. Biol. Chem.*, 1918, **35**, p. 425).
40. COLE (V.-V.) et KOCH (Fr.-C.). — A study on the phosphorus distribution in rat striated muscle as influenced by age, diet, and irradiated ergosterol. (*Journ. Biol. Chem.*, 1931, **94**, p. 263).
41. COLLAZO (J.-A.). — Untersuchungen über den Kohlenhydratstoffwechsel bei der Avitaminose. I. Ueber den Blutzucker. (*Bioch. Zeit.*, 1923, **134**, p. 194).
42. — Versuche über den N Stoffwechsel bei der Avitaminose. (*Bioch. Zeit.*, 1924, **145**; p. 436).
43. COLLAZO (J.-A.) et BOSCH (G.). — Ueber den Fettgehalt des Blutes bei Avitaminose. (*Bioch. Zeit.*, 1923, **141**, p. 370).
44. COLLISON (D.-L.), HUME (E.-M.), SMEDLEY-MACLEAN (I.) et SMITH (H.-H.). — The nature of the vitamin A constituent of green leaves (*Bioch. Journ.*, 1929, **23**, p. 634).
45. COWARD (K.-H.), KEY (K.-M.), DYER (F.-J.) et MORGAN (B.-C.-E.). — The determination of vitamin A. (*Bioch. Journ.*, 1930, **24**, p. 1.952).

46. CRAMER (W.), DREW (A.-H.) et MOTTRAM (J.-C.). — On blood platelets : their behaviour in vitamin A deficiency and after « radiation » and their relation to bacterial infection. (*Proc. Roy. Soc. B.* 1922, **93**, p. 449).
47. DENIGES (G.), CHELLE (L.) et LABAT (A.). — Précis de chimie analytique, Paris, Maloine 1930.
48. DRUMMOND (J.-C.). — A study of the water soluble accessory growth promoting substance. III. I Its influence upon the nutrition and nitrogen metabolism of the rat. (*Bioch. Journ.*, 1918, **12**, p. 25).
49. — The Lancet, 1918, **2**, p. 482.
50. — Researches on the fat soluble accessory substance. II. Observation on its role in nutrition and influence on fat metabolism. (*Bioch. Journ.*, 1919, **13**, p. 95).
51. DRUMMOND (J.-C.) et COWARD (K.-H.). — Researches on the fat soluble accessory substance. III. (*Bioch. Journ.*, 1920, **14**, p. 662).
52. — Researches on the fat soluble accessory substance. V. The nutritive value of animal and vegetable oils and fats considered in relation to their colour. (*Bioch. Journ.*, 1920, **14**, p. 668).
53. DUFFAU (R.). — Dosage des principales substances participant au métabolisme des glucides dans le muscle des animaux de laboratoire. (*Bull. Sc. Pharmac.*, 1936, **43**, p. 577).
54. — Influence de l'avitaminose B sur la composition du muscle du pigeon. (*C. R. Acad. Sc.*, 1937, **204**, p. 192).
55. — Variation du taux de quelques composés phosphoriques et dérivés glucidiques dans le muscle du rat sous l'influence du rachitisme expérimental et de sa guérison. (*C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, p. 1194).
56. DUMAZERT (C.). — Sur le microdosage iodométrique des aldoses et son application au dosage de la glycémie. (*Thèse Doct. Pharm.* Marseille, 1936).
57. DUTCHER (R.-A.), CREIGHTON (M.) et ROTHROCK (H.-A.). — Vitamin studies. XI. Inorganic blood phosphorus and bone ash in rats fed on normal, rachitic and uradiated rachitic diets. (*Journ. Biol. Chem.*, 1926, **66**, p. 405).
58. EGGLETON (Ph.) et EGGLETON (G.-P.). — The inorganic phosphor and a libile form of the inorganic phosphate in gastrocnemius of the frog. (*Bioch. Journ.*, 1927, **21**, p. 15).
60. EGGLETON (Ph.) et GROSS (L.). — A note on the blood sugar levels of rats with complete diets and diets deficient vitamin B. (*Bioch. Journ.*, 1925, **19**, p. 633).

61. EIJKMANN (C.). — Eine Beriberiähnliche Krankheit der Hühner. (*Virchow's Arch.*, 1897, **148**, p. 523).
62. ELLIS (N.-R., STEENBOCK (H.), et HART (E.-B.). — Some observations on the stability of the antiscorbutic vitamine and its behavi to various treatments. (*Journ. Biol. Chem.*, 1921, **46**, p. 367).
63. EMBDEN (G.). — Chemismus der Muskelkontraktion und Chemie der Muskulatur. (*Handb. d. norm. u. path. Phys.* 1925, **8**, p. 369).
64. EMBDEN (G.) et LAQUER (U.-F.). — Ueber die Chemie des Lactacidogens. (*Hoppe-Seylers Zeit.*, 1916-1917, **98**, p. 181).
65. EMBDEN (G.) et ZIMMERMANN (M.). — Ueber die Chemie des Lactadidogens. IV (*Hoppe-Seylers Zeit.*, 1924, **141**, p. 225); V (*Hoppe Seylers Zeit.*, 1927, **167**, p. 114).
66. — Ueber die Bedeutung der Adenylsäure für Muskel-funktion I. Mitt. Das Vorkommen von Adenylsäure in der Skelettmuskulatur. (*Hoppe-Seylers Zeit.*, 1927, **167**, p. 137).
67. EMERIQUE (L.). — Avitaminose A et métabolisme azoté. (*C. R. Acad. Sc.*, 1936, **203**, p. 1546).
68. ESPEZEL (P.). — L'acétaldéhyde dans les vins et les spiritueux. *Thèse Doct. Pharm.*, Montpellier, 1932.
69. EULER (H. von). — Ueber Wirkungsbedingungen von A Vitaminen. (*Arch. Kemi Mineralogi Geologi*, 1922, **8**, n° 19).
70. EVANS (H.-M.) et LEPKOVSKY (S.). — Sparing action of fat on the abtineiritic vitamin B. (*Journ. Biol. Chem.*, 1929, **83**, p. 269).
71. FISCHER (R.-B.). — Carbohydrate metabolism in birds. III. The effects of rest and exercice upon the lactic acid content of the organs of normal and rice-fed pigeons. (*Bioch. Journ.*, 1931, **25**, p. 1410).
72. FISKE (C.-H.) et SUBBAROW (Y.). — The colorimetric determination of phosphorus. (*Journ. Biol. Chem.*, 1935, **66**, p. 375).
73. — Phosphocretine. (*Journ. Biol. Chem.*, 1929, **81**, p. 628).
74. FLETCHER (W.-M.) et HOPKINS (F.-G.). — Lactic acid in amphibian muscle. (*Journ. Phys.*, 1907, **35**, p. 247).
75. FOLIN (O.). — A system of blood analysis. III. A new colorimetric method for the detremination of the amino-acid nitrogen in blood. (*Journ. biol. Chem.*, 1922, **51**, p. 377).
76. FOLIN (O.) et Wu (H.). — A system of blood analysis. (*Journ. biol. Chem.*, 1919, **38**, p. 81).
77. FONTES (G.) et THIVOLLE (L.). — Recherches expérimentales sur le microdosage des substances glucidiques du sang. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, **9**, p. 353).

78. — Sur la présence dans le sang de deux glucides réducteurs. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, p. 994).
79. FRASER (H.) et STANTON (A.-T.). — Etiology of beriberi. (*Lancet* 1910, p. 733 et 1735).
80. FRIEDMANN (T.-E.), COTONIO (M.) et SHAFFER (P.-A.). — The determination of lactic acid. (*Journ. biol. Chem.*, 1927, **73**, p. 335).
81. FUNK (C.). — On the chemical nature of the substance which cures polyneuritis in birds induced by a diet of polished rice. (*Journ. physiol.*, 1911, **43**, p. 395).
82. — The etiology of the deficiency diseases. (*Journ. State Med.*, 1912, **20**, p. 341).
83. — Ueber die physiologische Bedeutung gewisser bisher unbekannten Nahrungsbestandteile die Vitamine. (*Ergeb. d. Phys.*, 1913, **13**, p. 125).
84. — Studien über Beriberi XI. Mitteil. Die Rolle der Vitamine beim Kohlenhydrat-Stoffwechsel. (*Zeit. f. Phys. Chem.* 1914, **89**, p. 378).
85. — The nature of the disease due to the exclusive diet of cats in the guinea-pigs and rabbits. (*Journ. biol. Chem.*, 1916, **25**, p. 409).
86. — Action of the substance influencing the carbohydrate metabolism in experimental beriberi. (*Journ. Phys.*, 1919, **53**, p. 247).
87. FUNK (C.) et SCHONBORN (F.). — The influence of a vitamine free diet on the carbohydrate metabolism. (*Journ. Phys.*, 1914, **48**, p. 328).
88. FURTH (O.-V.) et CHARNAS (O.). — Ueber die quantitative Bestimmung der Milchsäure durch Ermittlung der darans abspaltbaren Aldehydmenge. (*Bioch. Zeit.*, **26**, p. 199, 1910).
89. GARCIA (I.). — Essai d'étude chimique du rapport squelette-masse active de l'organisme au cours de la croissance et de diverses carences. (*Thèse Pharm.* Marseille, Impr. Sémaphore, 1935).
90. — Recherches sur l'ossification. (*Thèse Doct. Sc. Natur.*, Montpellier, G. Patissier, à Trévoux, édit., 1935).
91. GENEVOIS (L.). — Chimie du muscle vivant. (*Biol. Méd.*, 1933, **23**, p. 400).
92. — Métabolisme cellulaire des substances glucidiques. (*Biol. Méd.*, 1935, **25**, p. 459).
93. GOLBLATT (H.). — A study of the relation of the quantity of fat soluble organic factor in the diet to the degree of calcification of the bones and the development of experimental rickets in rats. (*Bioch. Journ.*, 1923, **17**, p. 298).

94. HAGEDORN (H.-C.) et JENSEN (B.-N.). — Zur Microbestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid. (*Bioch. Zeit.*, 1923, **135**, p. 46).
95. HAMBURGER (R.) et COLLAZO (J.-A.). — Fettstoffwechsel und A Vitamin. (*Klin. Wochft.*, 1923, **2**, p. 1756).
96. HANDEL (M.). — Zur Frage der Acetonämie insbesondere bei der Avitaminose. (*Bioch. Zeit.*, 1924, **144**, p. 258).
97. HARAMAKI (K.). — Vitamine und Eissenstoffwechsel beim erwachsenen Individuum. (*Bioch. Zeit.*, 1922, **134**, p. 354).
98. HARDEN (A.) et YOUNG (W.-Y.). — The alcoholic ferment of yeast juice. Part. II. The coferment of yeast juise. (*Proc. Roy. Soc. Lond. B* (2), 1906, **78**, p. 369).
- Part III The function of phosphates in the fermentation of glucose. (*Proc. Roy. Soc.*, 1908, **80**, p. 299).
- Part IV. The function of phosphates in alcoholic fermentation. (*Proc. Roy. Soc.*, 1910, **82**, p. 321).
99. HENTSCHELL (H.) et ZOELLER (E.). — (*Zeit. Kinderheil*, 1927, **44**, p. 146).
100. HESS (A.-F.) et UNGER (L.-J.). — The clinical role of the fat soluble vitamin in relation to rickets. (*Journ. Amer. med. Assoc.*, 1920, **74**, p. 217).
101. HESS (A.-F.), WEINSTOCK (M.) et TOLSTOI (E.). — The influence of the diet during the preexperimental period on the susceptibility of rats to rickets. (*Journ. biol. Chem.*, 1923, **57**, p. 731).
102. HIRABAYASHI (N.). — Beitrag zum Stickstoff und mineral stoffwechsel bei Avitaminose. (*Bioch. Zeit.*, 1924, **145**, p. 18).
103. HOLMES (A.-D.) et TRIPP (F.). — Factors which influence the effectiveness of a rachitogenic ration. (*Journ. biol. Chem.*, 1932, **97**, p. 9).
104. HOLST (A.) et FROELICH (T.). — Experimental studies relating to ship beriberi and scurvy. (*Journ. Hyg.*, 1907, **7**, p. 634).
105. HOUGET (J.). — Modifications chimiques accompagnant la contraction musculaire et l'hyperthermie. II. Composition du muscle du foie et du sang de chiens normaux. (*Ann. Phys.*, 1933, **9**, n° 2, p. 245).
106. HOWARD (C.) et INGVALDSEN (F.). — The mineral metabolism of experimental scurvy of the monkey. (*Bull. Johns Hopkins Hosp.* 1917, **28**, p. 222-225).
107. JAULMES (P.) et ESPEZEL (P.). — Le dosage de l'acétaldéhyde dans les vins et les spiritueux. (*Ann. Falsif.*, 1935, **28**, p. 325).

108. JAVILLIER (M.). — La constitution chimique des vitamines. (*Bull. Soc. Pharmac.*, 1936, **43**, p. 337).
109. JAVILLIER (M.), BAUDE (P.) et LÉVY-LAJEUNESSE (Mlle S.). — Sur le dosage physiologique du facteur A. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1925, **7**, p. 831).
110. JAVILLIER (M.) et EMERIQUE (L.). — Sur l'activité vitaminique du carotène. (*C. R. Acad. Sc.*, 1930, **190**, p. 655).
111. JOLY (J.-M.). — Variations du quotient respiratoire et du métabolisme de base au cours de l'avitaminose B. (*C. R. Soc. Biol.* 1936, **122**, p. 196).
112. — Influence de l'ingestion de quelques hexoses (glucose, galactose, lévulose) sur le quotient respiratoire et le métabolisme de base en l'absence et en présence de vitamines B. (*Thèse Doct. Pharm.*, Paris, Ch. Brande, 1937).
113. KARR (W.-G.). — The influence of water soluble vitamine on the nutrition of dogs. (*Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1920, **17**, p. 84; et *Journ. biol. Chem.*, 1920, **44**, p. 255).
114. — Metabolism studies with diets deficient in water-soluble B vitamine. (*Journ. biol. Chem.*, 1920, **44**, p. 277).
115. KARRER (P.), HELFENSTEIN, WEHRLI, PIEPER et MORF. — Beitrag zur Kenntnis des Carotins der xanthophylle, des Fucoxanthins und Capsanthins. (*Helv. Chim. Acta*, 1931, **14**, p. 614).
116. KARRER, SCHOPP et BENZ. — Cités par GENEVOIS. Métabolisme cellulaire des substances glucidiques. (*Biol. Med.*, 1935, **25**, p. 474).
117. KAUFFMAN, COSLA et ROCHE. — Sur l'élimination d'acide lactique et d'aldéhyde acétique dans la dyscarbonie du diabète et la carence en vitamines A, B, C. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **2**, p. 807).
118. KINNERSLEY (H.-W.) et PETERS (R.-A.). — Observations upon carbohydrate metabolism in birds. I. The relation between the lactic acid content of the brain and the symptoms of opisthotonos in rice-fed pigeons. (*Bioch. Journ.*, 1929, **23**, p. 1126).
119. KORENCHEWSKY (V.) et CARR (M.). — Further experiments on the influence of the parents diet upon the young. II. (*Bioch. Journ.*, 1924, **18**, p. 1313).
120. KUHN (R.) et BROCKMANN (H.). — Carotin (Ueber das Vitamin des Wachstums IV. Mitteil.). (*Ber.*, 1933, **66**, p. 407).
121. KUHN (R.), GYORGY (P.) et WAGNER-JAUREGG (Th.). — Ueber eine neue Klasse von Natur Farbstoffen. (*Ber.*, 1933, **66**, p. 317). — Ovoflavin, Farbstoff des Eiklars. (*Ber.*, 1933, **66**, p. 576). — Lactoflavin, Farbstoff der Molke. (*Ber.*, 1933, **66**, p. 1034).

122. KUHN (R.) et LEDERER (E.). — Zerlegung des Carotins in seine Komponenten ueber das vitamin des Wachstums. I. Mitteil. (*Ber.*, 1931, **64**, p. 1349).
- Ueber α und β -Carotin. (*Zeit. phys. Chem.*, 1931, **200**, p. 246).
123. LECOQ (R.). — Les aliments et la vie. Paris, Vigot, 1929.
124. — Le rôle des vitamines B et de l'équilibre alimentaire dans l'utilisation des protides. (*C. R. Ac. Sc.*, 1932, **194**, p. 1267).
125. — L'utilisation des protides en relation avec les vitamines B et l'équilibre alimentaire de la ration. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, p. 1067).
126. — Valeur alimentaire et richesse en vitamines des dattes muscades. (*Bull. Soc. Botan. France*, 1933, **80**, p. 338).
127. — Protéides et vitamines B. I. Le rôle des vitamines B et de l'équilibre alimentaire dans l'utilisation des protéides par l'organisme. (*Bull. Sc. Pharmac.*, 1933, **40**, p. 470).
128. — Rôle de l'avitaminose B totale et de l'équilibre alimentaire dans l'utilisation du lactose par l'organisme du rat. (*C. R. Ac. Sc.*, 1933, **196**, p. 565).
129. — Glucides et vitamines B. III. Influence d'une forte proportion de glucides et d'un déséquilibre phosphocalcique sur la croissance du rat. (*Bull. Pathol. comp. Hyg. gén.* 1933, **33**, p. 1546).
130. — Bacilles lactiques et déséquilibre alimentaire. (*C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, p. 276).
131. — L'imprégnation lactique des tissus est-elle la véritable cause de la polynévrite aviaire ? (*C. R. Soc. Biol.*, 1935, **120**, p. 958).
132. — Production de polynévrite aviaire au moyen de régimes riches en glucides, en protides ou en lipides, comportant de fortes doses de vitamine B par simple addition d'acide lactique. (*C. R. Ac. Sc.*, 1936, **202**, p. 1304).
133. LECOQ (R.), et BARBAN (Mlle M.-L.). — Action antirachitique des méthylphosphates, des glycérophosphates et de la lécithine. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **117**, p. 671).
134. — Modification de l'activité antirachitique de l'acide orthophosphorique par fixation de chaînes œnoliques phénoliques et glucidiques. (*Bull. Soc. Hyg. Alim.*, 1935, **23**, p. 121).
135. LECOQ (R.) et DUFFAU (R.). — Sur la composition du muscle de pigeon normal adulte au repos. (*C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, p. 180).

136. — Influence du déséquilibre alimentaire aigu d'origine glucidique sur la composition du muscle du pigeon. (*C. R. Ac. Sc.*, 1937, **204**, p. 449).
137. LECOQ (R.) et JOLY (J.-M.). — Variations des échanges respiratoires causés chez le pigeon par le déséquilibre alimentaire d'origine glucidique. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, **19**, p. 144).
138. LECOQ (R.) et VILLETTE (H.). — Les bacilles lactiques, le lactose et l'étalon international de vitamine D envisagés comme facteurs de calcification chez les rats soumis au régime rachitigène. Randoin-Lecoq. (*Ann. Falsif. Fraudes*, 1933, **26**, p. 409).
139. — Les bacilles lactiques envisagées comme source de vitamines B. (*C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, p. 274).
140. LECOQ (R.) et VILLUIS (F.). — Action de quelques composés inorganiques sur l'évolution du rachitisme expérimental du rat. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, p. 630).
141. — Action de quelques glycérophosphates sur l'évolution du rachitisme expérimental du rat. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, p. 687).
142. LEHNARTZ (E.). — Der zeitliche Verlauf der Milchsäurebildung bei der Muskelkontraktion. (*Klin. Wochschr.*, 1931, **10**, p. 27).
143. — Ueber die nachträgliche Milchsäurebildung beim Tetanus und bei der Zuckung isolierter Frosch muskeln. (*Hoppe-Seylers Zeit.*, 1931, **197**, p. 55).
144. LEPPER (E.-H.) et ZILVA (S.-S.). — The bicarbonate of the plasma and the hydrogen ion concentration of the blood of guinea pig suffering from scurvy. (*Bioch. Journ.*, 1925, **19**, p. 581).
145. LEVENE (A.) et JACOBS (W.-A.). — Ueber Inosinsäure. (*Ber.*, 1911, **44**, p. 746).
146. LEVENE (P.-A.) et RAYMOND (A.-L.). — Hexosediphosphate. (*Journ. biol. Chem.*, 1928, **80**, p. 633).
147. LEWIS (H.-B.). — The antiscorbutic value of the banana. (*Journ. biol. Chem.*, 1919, **40**, p. 91).
148. LEWIS (H.-B.) et KARR (W.-G.). — Changes in the urea content of the blood tissues of guinea-pigs maintained on an exclusive oat diet. (*Journ. biol. Chem.*, 1916, **28**, p. 17).
149. LEWIS (R.-C.) et BENEDICT (S.-R.). — A method for the estimation of sugar in small quantities of blood. (*Journ. biol. Chem.*, 1915, **20**, p. 61).

150. LIANG BACKIANG et WACKER (L.). — Studien über den Fett-Cholesterin und Steroid Stoffwechsel im Organismus wachsender Ratten bei An- und Abwesenheit von vitamin A. (*Bioch. Zeit.*, 1925, **164**, p. 371).
151. LOHMANN (K.). — Ueber die hydrolyse des Glykogens durch das diastatische Ferment des Muskels. (*Bioch. Zeit.*, 1926, **178**, p. 444).
152. — Ueber die Isolierung verschiedener natürlicher Phosphorsäureverbindungen und die Frage ihrer Einheitlichkeit. (*Bioch. Zeit.*, 1928, **194**, p. 306).
153. — Ueber das Vorkommen und den Umsatz von Pyrophosphat in Zellen. I. (*Bioch. Zeit.*, 1928, **202**, p. 466).
154. — Ueber das Vorkommen und den Umsatz von Pyrophosphat in Zellen. II. (*Bioch. Zeit.*, 1928, **203**, p. 164).
155. — Ueber die Pyrophosphatfraktion in Muskel. (*Naturwiss.*, 1929, **17**, p. 624).
156. — Ueber das Koferment der Milchsäurebildung des Muskels. (*Naturwiss.*, 1931, **19**, p. 180).
157. LOHMANN (K.) et JENDRASSIK. — Kolorimetrische Phosphorsäurebestimmungen im Muskelextrakt. (*Bioch. Zeit.*, 1926, **178**, p. 419).
158. LUNDGAARD (E.). — Weitere untersuchungen über Muskel Kontraktionen ohne Milchsäurebildung. (*Bioch. Zeit.*, 1930, **227**, p. 39).
159. — Ueber die energetik der anaeroben Muskelkontraktion. (*Bioch. Zeit.*, 1931, **223**, p. 322).
160. MAGNE (H.) et SIMONNET (H.). — Sur les variations du quotient respiratoire chez le pigeon carencé. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1922, **4**, p. 419).
161. Mc CANN (G.) et BARNETT (M.). — Experimental rickets in rats. IX. The distribution of phosphorus and calcium between the skeleton and soft parts of rats on rachitic and non rachitic diets. (*Journ. Biol. Chem.*, 1922, **54**, p. 203).
162. Mc CLENDON (J.-F.), COLE (W.-C.), ENGSTRAND (O.) et MIDDLEKAUF (J.-E.). — The effects of malt and malt extracts on scurvy and on the alkaline reserve of the blood. (*Journ. biol. Chem.*, 1919, **40**, p. 243).
163. Mc COLLUM (E.-V.) et DAVIS (M.). — The necessity of certain lipins in the diet during growth. (*Journ. biol. Chem.*, 1913, **15**, p. 167).
164. — Nutrition with purified food substances. (*Journ. biol. Chem.*, 1915, **20**, p. 641).

165. Mc COLLUM (E.-V.), SIMMONDS (N.), BECKER (J.-E.) et SHIPLEY (P.-G.). — Studies on experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. (*Journ. biol. Chem.*, 1922, **53**, p. 293).
166. Mc COLLUM (E.-V.), SIMMONDS (N.), PARSONS (H.-T.), SHIPLEY (P.-G.) et PARK (E.-A.). — Studies on experimental rickets. I. The production of rachitic and similar diseases in the rat by deficient diets. (*Journ. biol. Chem.*, 1921, **45**, p. 333).
167. Mc COLLUM (E.-V.), SIMMONDS (N.), SHIPLEY (P.-G.) et PARK (E.-A.). — Studies on experimental rickets. XVI. (*Journ. biol. Chem.*, 1922, **54**, p. 41).
168. MELLANBY (E.). — An experimental investigation on rickets. (*The Lancet*, 1919, **1**, p. 407).
169. MEYERHOF (O.). — Ueber das Vorkommen des Coferments der Alkoholischen Hefegärung im Muskelgewebe und seine mutmassliche Bedeutung im Atmungsmechanismus (Vorläufige Mitteilung). (*Hoppe-Seylers Zeit.*, 1918, **101**, p. 165).
170. — Ueber das Gärungscoferment im Tierkörper. II Mitteilung. (*Hoppe-Seylers Zeit.*, 1918, **102**, p. 1).
171. — Die energiewandlungen im Muskels. (*Pflügers Arch.*, 1920, **182**, p. 284).
172. — Ueber die Milchsäurebildung in der zerschnittenen Muskulatur. (*Pflügers Arch.*, 1921, **188**, p. 114).
173. — Chimie de la contraction musculaire. Traduit et annoté par GENEVOIS (L.). (Bordeaux, Delmas et Herman et Cie, Paris, 1932).
174. MEYERHOF (O.) et LOHMANN (K.). — Ueber die enzymatische Milchsäurebildung im Muskelextrakt. IV. Die spaltung der Hexosemonophosphorsäuren. (*Bioch. Zeit.*, 1927, **185**, p. 113).
175. MICHAELIS (von L.). — Eine Mikroanalyse des Zuckers im Blut. (*Bioch. Zeit.*, 1914, **59**, p. 166).
176. MICHAUX (A.). — Recherches comparatives sur les humeurs et les organes du cobaye normal. (*Thèse Doct. Sc. Natur.*, Paris, 1929).
177. MICHEL (P.). — Essai sur la carence alimentaire. (*Thèse Doct. Méd.*, Lyon, 1916).
178. MIYADÈRE (K.). — Ueber die Beziehungen der Vitamin funktion zum Kalkstoffwechsel. (*Bioch. Zeit.*, 1922, **130**, p. 199).
179. MOORE (T.). — *Lancet*, 1929, p. 499).
— Vitamin A and carotene I. The association of vitamin a activity with carotene in the carrot root. (*Bioch. Journ.*, 1929, **23**, p. 803).

180. MORGAN (A.-F.) et OSBURN (D.-F.). — The effect of vitamin A deficiency upon the character of nitrogen metabolism. (*Journ. biol. Chem.*, 1925, **66**, p. 573).
181. MORGAN (W.-T.-J.) et ROBINSON (R.). — Constitution of hexose-diphosphoric acid. Part. II. The dephosphorylated α and β -methylhexosides. (*Bioch. Journ.*, 1928, **22**, p. 1270).
182. MORGULIS (S.) et JAHR (H.-M.). — Note on the Lewis-Benedict method of blood sugar determination. (*Journ. biol. Chem.*, 1915, **20**, p. 61).
183. MOURIQUAND (G.) et LEULIER (A.). — Avitaminose C (avec ou sans tuberculose) et cholestérine du sang et des surrénales. (*C. R. Acad. Sc.*, 1925, **181**, p. 434).
184. — Sur la teneur en cholestérine de quelques organes de cobayes soumis au régime scorbutigène. (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, p. 1314).
185. — Contribution à l'étude du terrain en pathologie. Recherches biochimiques sur le terrain carencé. (*Paris Méd.*, 1927, **17**, p. 436).
186. MOURIQUAND (G.), LEULIER (A.) et MICHEL (G.). — Fluctuations du fer sanguin au cours du scorbut expérimental. (*C. R. Acad. Sc.*, 1925, **180** p. 86).
187. — Dosage du phosphore et de la chaux du tissu osseux et des dents des animaux soumis à l'avitaminose. (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, **92**, p. 269).
188. — Avitaminose C et glycémie. (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, **92**, p. 271).
189. MOURIQUAND (G.), LEULIER (A.) et SEDALLIAN (P.). — Le pH et la réserve alcaline dans l'avitaminose C. (*C. R. Acad. Sc.*, 1927, **185**, p. 551).
190. MOURIQUAND (G.) et MICHEL (P.). — Parallélisme entre le degré de dessiccation et la perte du pouvoir antiscorbutique des végétaux frais. (*C. R. Soc. Biol.*, 1921, **84**, p. 41).
191. NACHMANSOHN (O.). — Ueber den Zerfall der Kreatinphosphorsäure in Zusammenhang mit der Tätigkeit des Muskels. I. (*Bioch. Zeit.*, 1928, **196**, p. 73).
192. NASSE (O.). — Chemie und Stoffwechsel der Muskeln. (*Hermanns Handb. d. Phys.*, 1879, **1**, p. 263).
193. NEF. — Dissociations vorgänge in der Zuckergruppe. Ueber das Verhalten der Zuckerarten gegen die Fehling'sche Lösung sowie gegen andere oxydations mittel. (*Liebigs Ann. d. Chem.* 1907, **357**, p. 214).
- Ueber das verhalten der Zuckerarten gegen Atzalkalien. (*Liebigs Ann. d. Chem.*, 1910, **376**, p. 1; 1914, **403**, p. 204).

194. NEUBERG (C.). — Ueberführung der Fructose-diphosphorsäure in Fructosemonophosphorsäure. (*Bioch. Zeit.*, 1918, **88**, p. 432).
195. NICHITA (G.) et IFTIMESCO (G.). — Recherches sur l'avitaminose du complexe B chez les poules Leghorn blanches. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **117**, p. 289).
196. NICOLAYSEN (R.). — Studies upon the mode of action of vitamin D. I. Investigations upon the phosphorus compounds in muscles liver and kidneys as influenced by different levels of vitamin D and phosphorus in the diet. (*Bioch. Journ.*, 1936, **190**, p. 1329).
197. NITZESCU et BENETATO. — Epreuve de la glycémie provoquée chez le pigeon carencé en facteur B antinévritique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, p. 375).
198. NITZESCU (I.-I.) et GONTZEA (I.). — Lactacidémie chez les poules et avitaminose B. (*C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, p. 562).
199. OHLSSON (E.). — Eine neue Methode zur Extraktion der Milchsäure. (*Skand. Arch. Phys.*, 1915, **33**, p. 231).
200. OSBORNE (T.-B.) et MENDEL (L.-B.). — Feeding experiments with fat free food mixtures. (*Journal Biol. Chem.*, 1912, **12**, p. 81).
201. — The relation of growth to the chemical constituents of the diet. (*Journ. Biol. Chem.*, 1913, **15**, p. 311).
202. — The nutritive value of the wheat Kernel and its milling products. (*Journ. Biol. Chem.*, 1919, **37**, p. 557).
203. PALLADIN (A.) et KUDRIAZEWA (A.). — Beitrage zur Biochemie der Avitaminosenstickstoffwechsel (insbesondere Kreatinstoffwechsel bei experimentellen Skorbut. (*Bioch. Zeit.*, 1924, **152**, p. 373).
204. — Beitrage zur Biochemie der Avitaminosen. V. Untersuchungen über den Stoffwechsel bei avitaminose ernährten Kaninchen. (*Bioch. Zeit.*, 1924, **154**, p. 104).
205. PALLADIN (A.) et SRAWRON. — Beitrage zur Biochemie der Avitaminosen. IV. Kalkausscheidung und Blutkalk beim experimentellen Skorbut. (*Bioch. Zeit.*, 1924, **153**, p. 86).
206. PALMER (L.-S.) et KENNEDY (C.). — The relation of plant carotinoids to growth and reproduction of albinos rats. (*Journ. Biol. chem.*, 1921, **46**, p. 559).
207. PAPPENHEIMER (A.-M.), Mc CANN (G.-F.) et ZUCKER (T.-F.). — Experimental rickets in rats. IV. (*Journ. exp. Med.*, 1922, **35**, p. 421).
208. — Experimental rickets in rats. V. (*Journ. exp. Med.*, 1922, **35**, p. 447).
209. PARNAS (J.-K.). — (*Zbl. Phys.*, 1915, **30**, p. 1).

210. PARNAS (J.-K.). — Les composés puriques du muscle et leurs transformations physiologiques. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, **11**, p. 803).
211. PARSONS (H.-I.). — The antiscorbutic content of certain body tissues of the rat. (*Journ. Biol. Chem.*, 1920, **44**, p. 587).
212. PATON (N.) et WATSON (A.). — The aetiology of rickets an experimental investigation. (*Brit. Journ. exp. Pathol.*, 1921, **2**, p. 75).
213. PINNOW (J.). — Verteilungskoeffizient und Extraktionsgeschwindigkeit einiger organischer Säuren. (*Zeit. anal. Chem.*, 1915, **54**, p. 321).
214. POWER (M.-H.) et CLAWSON (T.-A.). — Free sugar in liver and muscle tissue. (*Journ. biol. Chem.*, 1928, **78**, p. 66).
215. RAMOINO (P.). — Contribution à l'étude des alimentations incomplètes. Recherches sur l'échange gazeux dans l'alimentation avec du riz. (*Arch. Ital. Biol.*, 1916, **65**, p. 1).
216. RANDOIN (Mme L.), et LECOQ (R.). — Recherches qualitatives et quantitatives sur les vitamines hydrosolubles B dans les extraits de levure, dans les levures et dans les milieux de culture de ces levures. (*Journ. Pharm. Chim.*, 1927, **5**, p. 193).
217. — Influence des ferments amylytiques sur l'évolution de l'avitaminose B provoquée au moyen de régimes riches en amidon. (*Journ. Pharm. Chim.*, 1927, **6**, p. 340).
218. — A propos de l'existence probable de deux vitamines antiscorbutiques. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, p. 671).
219. — Constitution d'un nouveau régime artificiel pour l'étude du rachitisme expérimental. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, p. 1277).
220. — L'évolution de l'avitaminose B dans ses rapports avec la constitution des glucides du régime. (*C. R. Acad. Sc.*, 1927, **184**, p. 1347).
221. — Les vitamines hydrosolubles du groupe B. Essais de mis au point de la question jusqu'à ce jour. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, **11**, p. 745).
222. — A propos de la prétendue toxicité du galactose. Utilisation physiologique comparée du glucose et du galactose par l'organisme du pigeon. (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, **101**, p. 355).
- Equilibre alimentaire et laits artificiel. (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, **102**, p. 371).
223. — Constitution d'un nouveau régime artificiel défini, producteur d'avitaminose C, permettant l'étude du scorbut et la recherche de la vitamine antiscorbutique. (*Journ. Pharm. Chim.*, 1929, **10**, p. 337).

224. RANDOIN (Mme L.) et LELESZ (E.). — Variations comparatives de la glycémie artérielle (effective et protéidique) et de la teneur du foie en glycogène chez le pigeon normal et chez le pigeon soumis à un régime déséquilibré par manque de facteur hydrosoluble B. (*C.R. Acad. Sc.*, 1925, **180**, p. 1366).
225. — Avitaminose B, glycémie et réserves glycogéniques. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1926, **8**, p. 15).
226. RANDOIN (Mme L.) et LOPEZ LOMBA (J.). — Production du scorbut chez le cobaye et le lapin jeune au moyen d'un nouveau régime complet et biochimiquement équilibré, uniquement dépourvu de facteur C. (*C. R. Acad. Sc.*, 1923, **176**, p. 1003).
227. RANDOIN (Mme L.) et MICHAUX (Mlle A.). — Variations du taux de l'urée dans le sang du cobaye sous l'influence d'un régime déséquilibré par manque de facteur antiscorbutique. (*C. R. Acad. Sc.*, 1925, **180**, p. 1063).
228. — Réserves glycogéniques et glycémie artérielle (effective et protéidique) au cours du scorbut expérimental. (*C. R. Acad. Sc.*, 1925, **181**, p. 1179).
229. — Variations de la teneur en fer du foie, de la rate et du sang sous l'influence d'un régime déséquilibré par absence complète de vitamine antiscorbutique. (*C. R. Acad. Sc.*, 1927, **125**, p. 365).
230. — Variations comparatives de la teneur du foie et de la rate en eau, acides gras et cholestérol chez le cobaye normal et chez le cobaye soumis à un régime privé de vitamine antiscorbutique. (*C. R. Acad. Sc.*, 1928, **187**, p. 146).
231. — Sur la teneur des reins en eau, acides gras et cholestérol chez le cobaye normal et chez le cobaye soumis à un régime scorbutique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, p. 584).
232. — Variations comparatives de la teneur du sang en calcium et en fibrinogène chez le cobaye normal et chez le cobaye soumis à un régime privé de vitamine antiscorbutique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, **100**, p. 11).
233. RANDOIN (Mme L.), RAFFY (Mlle A.) et AGUIRREZABALA (L.). — Détermination de la réserve alcaline chez les cobayes normaux et scorbutiques. (*C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, p. 621).

234. RANDOIN (Mme L.) et SIMONNET (H.). — Influence de la nature et de la quantité des glucides présents dans une ration privée de facteur B sur la précocité de l'apparition des accidents de la polynévrite aviaire. (*C. R. Acad. Sc.*, 1923, **177**, p. 903).
235. — Equilibre alimentaire, isodynamie et substances élémentaires fondamentales. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1924, **6**, p. 601) et Le problème alimentaire envisagé au point de vue des rapports existant entre les substances élémentaires fondamentales et les substances énergétiques. (*C. R. Acad. Sc.*, 1924, **178**, p. 963).
236. — Sur l'équilibre alimentaire. Entretien du pigeon au moyen d'un régime totalement privé de facteur hydrosoluble B. (*C. R. Acad. Sc.*, 1924, **179**, p. 700).
237. — Croissance et entretien du rat soumis à un régime artificiel privé à la fois de facteur B et de glucides. (*C. R. Acad. Sc.*, 1924, **179**, p. 1219).
238. — La question des vitamines III. Le facteur hydrosoluble B. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1925, **7**, p. 678).
239. — Les données et les inconnues du problème alimentaire. II. La question des vitamines. (Paris, *Presses universitaires de France*, 1927).
240. RICHARDSON (H.-B.), SHORR I.E.) et LÆBEL (R.-O.). — Tissue metabolism. II. The respiratory quotient of normal and diabetic tissue. (*Journ. Biol. Chem.*, 1930, **86**, p. 551).
241. ROBISON (R.). — A new phosphoric ester produced by the action of yeast juice on hexoses. (*Bioch. Journ.*, 1922, **16**, p. 809).
242. ROBISON (R.) et KING (E.-J.). — Hexosemonophosphoric esters. (*Bioch. Journ.*, 1931, **25**, p. 323).
243. ROCHE (A.). — Des variations du rapport C/N urinaire du rat au cours de l'inanition et de la carence en facteur B. Différenciation de la mort par inanition et de la mort par avitaminose B. (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, **2**, p. 671).
244. ROCHE (J.). — Recherches sur le phosphore acidosoluble du sang. II. Sur la participation de corps phosphorés au pouvoir réducteur du sang. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, p. 636).
245. SALMON (W.-D.) et LIVINGSTON (C.-W.). — (*Journ. Home Econom.* 1925, **17**, p. 129).
246. SAVARE (J.). — Recherche des vitamines dans l'huile d'olive, spécialement dans différents types d'huile d'olive de Tunisie par la méthode expérimentale sur les animaux. (*Thèse Doct. Pharm.*, Paris, Vigot, 1933).

247. SCHAUMANN iH.). — Die Aetiologie der Beriberi unter Berücksichtigung des gesamten Phosphorstoffwechsels. (*Arch. Schiffs Trop. Hyg.*, 1910, **14**, p. 325).
248. SCOTTI-FOGLIENI. — (*Boll. d. Soc. d. Biol. Sper.*, 1926, **1**, fasc. 5).
249. SCHEPILEWSKYA et JARUSSAVA (N.). — Zur Frange nach dem experimentellen Skorbut der Meerschweinchen. (*Bioch. Zeit.*, 1925, **167**, p. 245).
250. SHARP (J.-G.). — Diminution du glycogène et accumulation de l'acide lactique dans les muscles de poissons « post-mortem » à basses températures. (*Bioch. Journ.*, 1935, **29**, p. 850).
251. — The phospholipin of the blood and liver in experimental rickets in dogs. (*Bioch. Journ.*, 1922, **16**, p. 486).
252. SHERMANN iH.-C.) et PAPPENHEIMER (A.-M.). — A dietetic production af rickets in rats and its prevention by an organic salt. (*Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 1920, **18**, p. 193).
253. — Experimental rickets in rats. I. (*Journ. exp. Med.*, 1921, **34**, p. 189).
254. SIMONNET (H.). — Le facteur liposoluble A, la croissance et la reproduction. (*Thèse Doct. Sc. Nat.*, 1925, Paris).
255. SIVADJIAN (J.). — Les vitamines et les hormones. Paris, Gauthier-Villars, 1937.
256. SMITH (Th.). — Bacilli in Swine disease. (*U. S. Dep. Agr., Bur. of Anim. Industry, Ann. Rep.*, 1895, p. 86).
257. STEENBOCK (H.) et BLACK (A.). — Fat solubles vitamins. XXIII. (*Journ. Biol. Chem.*, 1925, **64**, p. 263).
258. STEENBOCK (H.) et BOUTWELL (P.-W.) — Fat soluble vitamine. VII. The extractibility of fat-soluble vitamine from carrots alfalfa and yellow corn by fat solvents. (*Journ. Biol. Chem.*, 1920, **35**, p. 517).
259. STEENBOCK (H.) et GROSS (E.-G.). — Fat soluble vitamine. IV. The fat soluble vitamine content of green plant tissues together with some observations on their water soluble vitamine content. (*Journ. Biol. Chem.*, 1920, **41**, p. 149).
260. STEPP (W.). — Versuche über Futtererrung mit Lipoidfrei Ernährung. (*Bioch. Zeit.*, 1909, **22**, p. 452).
261. SUGIURA (K.) et BENEDICT (S.-R.). — A study of the adequacy of certain synthetic diets for the nutrition of pigeons. (*Journ. Biol. Chem.*, 1923, **55**, p. 33).
262. SZENT-GYORGYI (A.) et SVIRBELY (J.-L.). — The chemical nature of vitamin C. (*Bioch. Journ.*, 1932, **26**, p. 865).
263. THEPENIER (A.). — Les sucres du sang. Leurs dosages par la méthode de Bang avec table à calcul. (*Thèse Doct. Med.*, Paris, Girault, 1924).

264. THOMPSON (R.-H.-S.) et JOHNSON (R.-E.). — Blood pyruvate in vitaminB₁ deficiency. (*Bioch. Journ.*, 1935, **29**, p. 695).
265. TOMODA. — Méthode simple pour la détermination de l'acétaldéhyde. (*Journ. Soc. Chem. Industry*, 1929, **84**, p. 76).
266. TSUJI (M.). — Ueber den Stoffwechsel bei Vitaminfreier Ernährung. (*Bioch. Zeit.*, 1922, **129**, p. 1944).
267. Van SLYKE (L.-L.) et BAKER (J.-C.). — Free lactic acid in sour milk. (*Journ. Biol. Chem.*, 1918, **35**, p. 147).
268. VILLETTE (H.). — Relation entre les développement des bacilles lactiques d'origines différentes, cultivés sur bouillon de touraillon et la quantité d'acide lactique produit. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, p. 315).
269. — Action comparée des bacilles lactiques, de quelques composés du phosphore et de l'ergostérol irradié dans le traitement du rachitisme expérimental. (*Thèse Doct. Pharm.*, Paris, Vigot, 1934).
270. VILLUIS (F.). — Influence de quelques sels minéraux et organiques du phosphore sur l'évolution du rachitisme expérimental du rat. (*Thèse Doct. Pharm.*, Paris, Ch. Brande, 1932).
271. WARBURG (O.). — Ueber die Wirkung von Blausäureäthylester (Athylcarbylamin) auf die Pasteursche Reaktion. (*Bioch. Zeit.*, 1926, **172**, p. 432).
272. WARBURG (O.) et CHRISTIAN (W.). — Ueber ein neues Oxydations ferment und sein Absorptions Spektrum. (*Bioch. Zeit.*, 1932, **254**, p. 438).
273. WAREMBOURG (H.). — Les hyperglycémies. Etude clinique et physiopathologique. (Paris, Masson et Cie, 1936).
274. WEILL (E.) et MOURIQUAND (G.). — Les maladies alimentaires par carence. (*Lyon Méd.*, 1914, **122**, p. 1504).
275. WIERZCHOWSKI (Z.). — Studja nad witaminami. Czesé II. (Etudes sur les vitamines, 2^e partie). (*Mémoires de l'Institut National Polonais d'économie rurale*, Pulawy, 1924, **5**, A, p. 15).
276. WILLIAMS (R.-R.). — Structure of vitamine B. (*Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1935, **57**, p. 229).
277. WINDAUS (A.), LUTTRINGHAUS (A.) et DEPPE. — Ueber das Krystallisierte Vitamin D. (*Lieb. Ann.*, 1931, **489**, p. 252).
278. WINDAUS (A.), TSCHESCHE et GREWE (R.). — Ueber das anti-neuritische Vitamin. (*Zeit. Phys. Chem.*, 1935, **237**, p. 98).
279. ZUCKER (T.-E.), PAPPENHEIMER (A.-M.) et BARNETT (M.). — Observations on cod liver and rickets. (*Proc. Exp. Biol. Med.*, 1922, **19**, p. 167).

ADDENDUM

- 55 *bis.* DUFFAU (R.). — Influence de l'avitaminose C sur le métabolisme des glucides dans le muscle du cobaye. (*C. R. Soc. Biol.* 1937, **125**, p. 436).
- 197 *bis.* NITZESCU (I.-I.), BENETATO (Gr.), et OPREAN (R.). — Nouvelles recherches sur le métabolisme des glucides dans l'avitaminose B¹. (*C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, p. 188).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.	1
<i>Chapitre I.</i> — Exposé du métabolisme des glucides dans le muscle.	5
<i>Chapitre II.</i> — Etude critique des techniques de dosage des principales substances intervenant dans le métabolisme glucidique du muscle.	27
<i>Chapitre III.</i> — Application des techniques de dosage précédemment choisies au muscle de quelques animaux de laboratoire.	57
<i>Chapitre IV.</i> — Les vitamines, leur mise en évidence, leur structure chimique.	83
<i>Chapitre V.</i> — L'avitaminose A et le métabolisme des glucides dans le muscle.	95
<i>Chapitre VI.</i> — Le rachitisme expérimental et le métabolisme des glucides dans le muscle.	107
<i>Chapitre VII.</i> — L'avitaminose C et le métabolisme des glucides dans le muscle.	125
<i>Chapitre VIII.</i> — L'avitaminose B et le métabolisme des glucides dans le muscle.	143
<i>Chapitre IX.</i> — Le déséquilibre alimentaire et le métabolisme des glucides dans le muscle.	161
CONCLUSIONS.	175
BIBLIOGRAPHIE.	176



IMPRIMERIE SPECIALE
DE
MM. VIGOT Frères



